

A38R44
B7
OFF

Recherches Agronomiques

MONOGRAPHIE

LES BACTÉRIES LACTIQUES ET LES LAITS FERMENTÉS

ÉDOUARD BROCHU

RENÉ RIEL

CLAUDE VÉZINA

LE CONSEIL DES RECHERCHES AGRICOLES

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE
DE LA PROVINCE DE QUÉBEC

1959

No 3



Bibliothèque Nationale du Québec

Rév. Père Donat.
En témoignage d'amitié sincère
et de reconnaissance,
E. Brochu

Monographie

LES BACTÉRIES LACTIQUES ET LES LAITS FERMENTÉS

A38R44

B7

OFF

RECHERCHES AGRONOMIQUES

MONOGRAPHIE

LES BACTERIES LACTIQUES
ET
LES LAITS FERMENTÉS

ÉDOUARD BROCHU

Professeur d'Industrie Laitière et de Bactériologie
Institut Agricole d'Oka, La Trappe, Québec, Canada

RENÉ RIEL

Service des Sciences, Ferme Expérimentale Centrale
Ottawa, Ontario, Canada

CLAUDE VÉZINA

Professeur de Bactériologie
Institut Agricole d'Oka, La Trappe, Québec, Canada

LE CONSEIL DES RECHERCHES AGRICOLES

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE
DE LA PROVINCE DE QUÉBEC

1959

No 3

RECHERCHES AGROLOGIQUES

MONOGRAPHIE

LES BACTERIES LACTIQUES

LES LAITS FERMENTES

PAR M. G. GONNILLON

Docteur en Médecine, Directeur de l'École Supérieure de Pharmacie de Montpellier

PAR M. J. GONNILLON

Docteur en Médecine, Directeur de l'École Supérieure de Pharmacie de Montpellier

PAR M. J. GONNILLON

Docteur en Médecine, Directeur de l'École Supérieure de Pharmacie de Montpellier

PAR M. J. GONNILLON, DOCTEUR EN MÉDECINE, DIRECTEUR DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE DE MONTPELLIER

PAR M. J. GONNILLON, DOCTEUR EN MÉDECINE, DIRECTEUR DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE DE MONTPELLIER

1900

PRÉFACE

Depuis 1949, grâce aux octrois du Conseil des Recherches Agricoles de la Province de Québec, la section de bactériologie et de technologie laitière de l'Institut Agricole d'Oka a pu poursuivre des recherches sur divers aspects biochimiques des bactéries lactiques. On y a particulièrement étudié l'influence de ces bactéries sur diverses vitamines du lait, leur capacité de synthèse vitaminique en milieux purifiés, leur pouvoir antibiotique et leurs effets sur la digestibilité des laits fermentés.

Les bactéries lactiques jouent un rôle primordial dans le comportement de l'homme et des animaux de toutes catégories. Elles possèdent, semble-t-il, des propriétés protectrices essentielles et sont utilisées comme agents thérapeutiques. Elles entrent dans la préparation de nombreux aliments, spécialement des fromages et des laits fermentés. L'étude de leurs propriétés revêt, en conséquence, une importance particulière.

Nos connaissances des bactéries lactiques, surtout dans le domaine pratique, sont bien incomplètes. Les travaux de recherches que nous poursuivons depuis plusieurs années sur ces bactéries ont pour but de clarifier divers points obscurs et de connaître davantage certaines propriétés importantes des principales espèces de ce groupe.

Nous adressons nos plus sincères remerciements aux autorités du Ministère de l'Agriculture de la Province de Québec et à son Conseil des Recherches Agricoles, qui ont subventionné nos travaux et en assurent présentement la publication.

L'Institut Agricole d'Oka, par sa bibliothèque, ses laboratoires et son personnel, a rendu possible la réalisation de nos recherches ; nous lui en sommes très reconnaissants et lui exprimons notre profonde gratitude.

Nos remerciements s'adressent également à monsieur J.-Ls Bégin, du Ministère de l'Agriculture, pour sa généreuse collaboration dans la correction des épreuves et la mise en pages.

É. BROCHU

R. RIEL

C. VÉZINA

1911

January 1st - New Year's Day. A fine day with a light frost. The children went to school as usual. The weather was very pleasant for the time of year.

January 2nd - A very cold day with a heavy frost. The children went to school. The weather was very pleasant for the time of year.

January 3rd - A very cold day with a heavy frost. The children went to school. The weather was very pleasant for the time of year.

January 4th - A very cold day with a heavy frost. The children went to school. The weather was very pleasant for the time of year.

January 5th - A very cold day with a heavy frost. The children went to school. The weather was very pleasant for the time of year.

January 6th - A very cold day with a heavy frost. The children went to school. The weather was very pleasant for the time of year.

January 7th - A very cold day with a heavy frost. The children went to school. The weather was very pleasant for the time of year.

January 8th - A very cold day with a heavy frost. The children went to school. The weather was very pleasant for the time of year.

TABLE DES MATIÈRES

<i>Préface</i>	V
----------------------	---

PREMIÈRE PARTIE

INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA TENEUR DU LAIT EN VITAMINES.....	1
--	---

I. HISTORIQUE GÉNÉRAL SUR LA SYNTHÈSE DES VITAMINES PAR LES MICROORGANISMES.....	5
---	---

OBSERVATIONS PRÉLIMINAIRES	
MICROORGANISMES VS SYNTHÈSE DES VITAMINES	
BIOSYNTHÈSE INTESTINALE DES VITAMINES	
RÉFECTION	
ALIMENTATION VS SYNTHÈSE INTESTINALE	
Influence des glucides, des lipides, des protides	
Influence des vitamines	
SYNTHÈSE DES VITAMINES PAR LES BACTÉRIES LACTIQUES	
SOMMAIRE	
BIBLIOGRAPHIE	

II. INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA TENEUR DU LAIT EN THIAMINE.....	17
---	----

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	17
----------------------------	----

RÔLE DES PROTOZOAIRE	
RÔLE DES LEVURES	
RÔLE DES MOISSURES	
RÔLE DES BACTÉRIES	
BIOSYNTHÈSE INTESTINALE	
BIOSYNTHÈSE CHEZ LES RUMINANTS	
BIOSYNTHÈSE CHEZ L'HOMME	
SOMMAIRE	

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.....	22
--------------------------	----

MATÉRIEL ET MÉTHODES	
Cultures bactériennes	
Réactifs	
Préparation de l'extrait	
Préparation du thiochrome	
Acidité	
RÉSULTATS	
DISCUSSION	
CONCLUSION	

BIBLIOGRAPHIE.....	37
--------------------	----

III. INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA TENEUR DU LAIT EN RIBOFLAVINE.....	43
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	43
RÔLE DES LEVURES	
RÔLE DES MOISSURES	
RÔLE DES BACTÉRIES	
BIOSYNTHESE INTESTINALE	
BIOSYNTHESE CHEZ LES RUMINANTS	
BIOSYNTHESE CHEZ L'HOMME	
SOMMAIRE	
ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.....	47
MATÉRIEL ET MÉTHODES	
Cultures bactériennes	
Réactifs	
Préparation de l'extrait aqueux	
Acidité	
RÉSULTATS	
DISCUSSION	
CONCLUSION	
BIBLIOGRAPHIE.....	61
IV. INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA TENEUR DU LAIT EN ACIDE NICOTINIQUE.....	67
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	67
RÔLE DES LEVURES	
RÔLE DES MOISSURES	
RÔLE DES BACTÉRIES	
BIOSYNTHESE INTESTINALE	
BIOSYNTHESE CHEZ LES RUMINANTS	
BIOSYNTHESE CHEZ L'HOMME	
SOMMAIRE	
ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.....	70
MATÉRIEL ET MÉTHODES	
Cultures bactériennes	
Choix de la méthode	
Réactifs	
Milieux de culture	
Cultures de <i>Lactobacillus arabinosus</i> 17-5	
Détermination de l'acide nicotinique	
RÉSULTATS	
DISCUSSION	
Bactéries thermophiles	
Bactéries mésophiles A	
Bactéries mésophiles B	
Microorganismes du kéfir	
CONCLUSION	
BIBLIOGRAPHIE.....	89

V. INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA TENEUR DU LAIT EN ACIDE PANTOTHÉNIQUE.....	95
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	95
RÔLE DES PROTOZOAIREs	
RÔLE DES MOISSURES	
RÔLE DES LEVURES	
RÔLE DES BACTÉRIES	
Bactéries exigeant la vitamine intacte	
Bactéries synthétisantes	
Synthèse totale	
Synthèse partielle	
Formes conjuguées	
BIOSYNTHÈSE INTESTINALE	
BIOSYNTHÈSE CHEZ LES RUMINANTS	
BIOSYNTHÈSE CHEZ L'HOMME	
ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.....	102
MATÉRIEL ET MÉTHODES	
Cultures bactériennes	
Choix de la méthode	
Principe de la méthode	
Réactifs	
Milieux de culture	
Cultures de <i>Lactobacillus arabinosus</i> 17-5	
Détermination de l'acide pantothénique	
RÉSULTATS	
DISCUSSION	
Bactéries thermophiles	
Bactéries mésophiles A	
Bactéries mésophiles B	
Bactéries du kéfir	
CONCLUSION	
BIBLIOGRAPHIE.....	121
VI. INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA TENEUR DU LAIT EN ACIDE ASCORBIQUE.....	129
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	129
DESTRUCTION MICROBIENNE DE L'ACIDE ASCORBIQUE	
SYNTHÈSE MICROBIENNE DE L'ACIDE ASCORBIQUE	
BIOSYNTHÈSE INTESTINALE	
SOMMAIRE	
ÉTUDE EXPÉRIMENTALE.....	132
MATÉRIEL ET MÉTHODES	
Cultures bactériennes	
Description de la méthode	
Détermination de l'acide ascorbique dans le lait	

RÉSULTATS	
DISCUSSION	
Bactéries thermophiles	
Bactéries mésophiles A	
Bactéries mésophiles B	
Microorganismes du kéfir	
CONCLUSION	
BIBLIOGRAPHIE	149
SUMMARY: INFLUENCE OF LACTIC ACID BACTERIA ON VITAMIN CONTENT OF MILK	151

DEUXIÈME PARTIE

PROPRIÉTÉS BACTÉRIOSTATIQUE ET BACTÉRICIDE DES LAITS FERMENTÉS	155
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	156
Les substances inhibitrices naturelles du lait	
Les substances inhibitrices accidentelles dans le lait	
Les substances inhibitrices produites par les démarreurs	
Activité antibiotique du yoghourt	
Méthodes de détermination des antibiotiques dans le lait	
MATÉRIEL ET MÉTHODES	161
Laits fermentés	
Acidité et pH	
Essai de la pénicilline	
Spectres bactéricide et bactériostatique	
RÉSULTATS	164
Activité antibiotique des laits fermentés	
Spectres bactéricide et bactériostatique	
DISCUSSION	176
CONCLUSION	176
BIBLIOGRAPHIE	177
SUMMARY: ANTIBIOTIC POWER OF FERMENTED MILKS	183

TROISIÈME PARTIE

DIGESTIBILITÉ DES LAITS FERMENTÉS.....	187
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	189
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	192
Laits	
Digestion artificielle	
Prélèvement des échantillons	
Fractionnement des échantillons	
Détermination de l'azote	
RÉSULTATS.....	194
DISCUSSION.....	203
CONCLUSION.....	204
BIBLIOGRAPHIE.....	205
SUMMARY : DIGESTIBILITY OF FERMENTED MILKS.....	207

APPENDICE..... 211

SYNTHÈSE DES VITAMINES PAR LES BACTÉRIES LACTIQUES EN MILIEUX PURIFIÉS.....	211
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	212
Bactéries lactiques	
Conditions d'incubation	
Milieu d'inoculation	
Milieu purifié	
Dosage de la thiamine et de la riboflavine	
RÉSULTATS.....	214
Milieu d'inoculation	
Milieu purifié	
Synthèse de la thiamine et de la riboflavine	
DISCUSSION.....	223
Synthèse de la thiamine	
Synthèse de la riboflavine	
CONCLUSION.....	224
BIBLIOGRAPHIE.....	224

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

THE YACHT

PREMIÈRE PARTIE

INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA
TENEUR DU LAIT EN VITAMINES

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

LIBRARY OF THE UNIVERSITY OF CHICAGO

1000 UNIVERSITY DRIVE

HISTORIQUE GÉNÉRAL SUR LA SYNTHÈSE DES VITAMINES
PAR LES MICROORGANISMES

THE HISTORY OF THE
LAW OF THE

HISTORIQUE GÉNÉRAL SUR LA SYNTHÈSE DES VITAMINES PAR LES MICROORGANISMES

OBSERVATIONS PRÉLIMINAIRES

Le concept de la biosynthèse des vitamines s'est précisé lentement. Déjà Pasteur (1885) attribue un rôle essentiel à la flore intestinale dans la digestion complète des aliments. Plus tard, Nuttall et Thierfelder (1895), travaillant avec des cobayes en conditions stériles, arrivent à la conclusion que les mammifères peuvent vivre et utiliser leurs aliments sans le concours des microbes. Cependant, Schottelius (1898, 1902) obtient des résultats contraires avec des poussins élevés aseptiquement et conclut que les microbes sont indispensables à la vie des jeunes oiseaux. Ces résultats contradictoires s'expliquent par la difficulté de maintenir la stérilité absolue pendant un temps assez long chez de tels animaux. Metchnikoff (1901) parvient à élever stérilement des têtards de grenouille pour chercher l'influence des microbes sur leur développement. Le résultat de son expérience lui permet d'affirmer que les microbes sont nécessaires à la vie et au développement des têtards.

Osborne et Mendel (1911) constatent que les rats soumis à une diète purifiée peuvent perdre temporairement du poids et, après un laps de temps assez long, devenir coprophages avec le résultat étonnant d'une restauration intégrale. Ils démontrent aussi que les fèces de rats nourris normalement contiennent un facteur de croissance. À cette époque, de telles observations n'étaient pas interprétables, en raison de l'ignorance à peu près complète des vitamines. Dans le même temps, Cooper et Funk (1911), à la suite de leurs travaux sur la cause du bérubéri, rapportent que les diètes exclusivement glucidiques (amidon, inuline, sucrose, dextrine) provoquent la polynévrite avec les symptômes usuels. Plus tard, Cooper (1914) démontre que les extraits alcooliques des excréments de poules nourries au grain entier et ceux des fèces de lapins nourris au pain et au chou

guérissent la polynévrite chez le pigeon. Cette constatation lui permet d'être le premier à formuler l'hypothèse de la synthèse bactérienne des substances antinévritiques.

MICROORGANISMES VS SYNTHÈSE DES VITAMINES

Plusieurs chercheurs arrivent à la conclusion que diverses espèces bactériennes engendrent des substances de croissance. Bottomley (1914-15), dans une étude de la valeur fertilisante de la tourbeensemencée d'un mélange d'organismes aérobies, constate que cette tourbe, après stérilisation, constitue un excellent milieu de culture pour les microbes fixateurs d'azote. Les résultats sont tels qu'il conclut à la présence de substances capables de stimuler la croissance de façon remarquable. Quelques années plus tard, Bottomley (1917) lui-même confirme cette observation. Dans ses expériences sur *Lemna minor*, il précise que les plantes sont très sensibles à ces substances (qu'il appelle auximones), et qu'elles ne peuvent maintenir une croissance normale et se multiplier pendant longtemps en l'absence de ces principes essentiels à l'utilisation et à l'assimilation des éléments minéraux. Il ajoute que les plantes supérieures sont incapables de former de telles substances, mais les obtiennent du sol où elles sont formées par les bactéries. Jones (1917) corrobore le travail de Bottomley. Il observe que l'addition de cultures bactériennes à la tourbe, utilisée comme fertilisant du sol pauvre, favorise le développement et le verdissement des légumes cultivés. Pacini et Russell (1918) signalent des substances semblables, dans des extraits de cultures de *Bacillus typhosus* servis à des rats blancs.

Cantani (1909) avait déjà rapporté que *Bacillus influenzae* croît plus abondamment lorsqu'il est cultivé en symbiose avec *Bacillus diphtheriae*, *Micrococcus gonorrhoeae* et certains staphylocoques et que des suspensions de bactéries mortes stimulent la croissance de *Bacillus influenzae*. Thjotta (1921) a pu cultiver le même bacille avec des suspensions stériles du bacille de Friedlander et du bacille Ozena, de même qu'avec des extraits aqueux de ces organismes ou de *Bacillus proteus*.

Dans ses observations sur les facteurs de croissance d'origine bactérienne, Damon (1923) rapporte qu'il est possible de prévenir les syndromes de déficience en vitamine B chez le rat, en enrichissant sa ration de 5% d'une culture d'un organisme aérobie sporulant, de *Bacillus adhoerens*, du bacille de Friedlander, du bacille de Pfeiffer ou de *Bacillus timothy*. L'année suivante, Damon (1924) sert à de jeunes rats une ration carencée en vitamine B, mais enrichie de certaines bactéries, telles que *Bacillus timothy*, *Bacillus smegmatis* et *Bacillus moelleri*. La croissance rapide des rats ainsi nourris semble attribuable à une substance stimulante contenue dans le protoplasme bactérien. Damon croit, en outre, que *Bacterium coli*, *Bacterium paratyphosum* et *Bacillus subtilis* peuvent synthétiser la vitamine B.

En poursuivant des travaux analogues, Robertson (1924a) démontre que la levure peut croître continûment dans le filtrat d'un milieu synthétique dans lequel *Bacillus coli* a été cultivé pendant 68 générations, alors qu'elle est impuissante à se maintenir sur le milieu original. L'auteur tire la conclusion que *Bacillus coli* est capable de croître sur un milieu dépourvu de vitamines et qu'en conséquence il synthétise une ou plusieurs substances favorisant la croissance continue de la levure dans le filtrat. Peu après, Robertson (1924b) démontre que plusieurs espèces communes de bactéries (*Bacillus coli*, *Bacillus prodigiosus*, *Bacillus proteus*, *Bacillus pyocyaneus*, *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*) peuvent croître sur un milieu synthétique où d'autres espèces meurent après quelques réinoculations. Par ailleurs, Zajdel et Funk (1925) croient que la synthèse des vitamines peut aussi s'effectuer par certaines levures.

À la lumière de ces observations, il semble donc que certains microbes peuvent, dans des conditions particulières, synthétiser les vitamines.

BIOSYNTHÈSE INTESTINALE DES VITAMINES

Il est généralement admis que les animaux supérieurs sont incapables de synthétiser les vitamines. Une déficience diététique en certains facteurs ne tarde pas à se manifester par des syndromes bien définis, qui disparaissent subséquemment à l'addition de ces substances à la ration.

Les premières hypothèses relatives à la biosynthèse intestinale des vitamines remontent à Cooper (1914). Peu après, Theiler *et al.* (1915), dans une étude des maladies par carence, émettent l'hypothèse que la vitamine B est aussi synthétisée dans le tube intestinal des ruminants. Ces hypothèses ont reçu entière confirmation par les nombreux travaux qu'elles ont suscités.

Steenbock *et al.* (1923) s'efforcent d'interpréter les observations antérieures d'Osborne et de Mendel. Travaillant sur la composition des mélanges minéraux à ajouter aux rations synthétiques, ces chercheurs prennent d'abord pour acquis le fait que les substances minérales des fèces peuvent être très utiles aux rats coprophages. Ils sont alors surpris de constater que la malnutrition n'est pas causée par une insuffisance minérale. Ils entreprennent donc de déterminer la quantité de vitamine B nécessaire à la ration. Ces expériences les mènent à une découverte inattendue. Les rats, élevés dans les conditions usuelles de laboratoire, croissent et se développent normalement avec une certaine ration synthétique. Cependant, lorsqu'ils sont placés dans des cages à fond grillagé, qui leur refusent accès à leurs fèces, la croissance est défectueuse. Dans ces conditions, la ration doit contenir deux fois plus de vitamine B pour l'obtention d'un développement normal.

Plusieurs expérimentateurs ont corroboré cette observation. Dutcher et Francis (1923-24) démontrent que le rat est limité dans son pouvoir d'emmagasiner la vitamine B. En effet, les rats gardés sur grillage excrètent, après deux semaines,

des fèces qui semblent avoir perdu leurs propriétés stimulantes. Cowgill *et al.* (1925) affirment que les fèces peuvent contenir des quantités appréciables de vitamine B. Salmon (1925) récolte plus de vitamine B dans les fèces des rats que leur diète de blé ou d'avoine n'en contenait. Il note également que la croissance des rats privés de vitamine B s'améliore, s'ils ont accès à leurs excréments. Heller *et al.* (1925) mentionnent, de leur côté, que les animaux d'expérimentation, gardés dans les conditions usuelles de laboratoire, ne souffrent pas aussi rapidement des rations dépourvues de vitamines que ceux qui reçoivent la même ration mais qui sont élevés sur grillage. Les fèces servies à des animaux dont le développement a cessé avec la ration d'essai provoquent une accélération de croissance. Ils en déduisent que les microorganismes sporulants, présents dans le tube intestinal durant la première partie de l'expérience, synthétisent et emmagasinent la vitamine B. La croissance continue de ces animaux, concluent-ils, est due à la vitamine B additionnelle d'origine microbienne.

Bechdel *et al.* (1926), portant leur attention sur les exigences en vitamine B du veau, révèlent que cet animal peut se développer normalement jusqu'à maturité et se reproduire avec une ration dont le contenu en vitamine B est insuffisant pour assurer la croissance et le bien-être général du rat. Assumant que le veau possède des exigences physiologiques en vitamine B similaires à celles des autres animaux, les auteurs concluent que le bon comportement du veau ne peut s'expliquer que par la synthèse du facteur B par les microorganismes du système digestif. Peu après, Bechdel et Honeywell (1927) établissent que la teneur en vitamines B du lait n'est pas influencée par la ration et déduisent que sa synthèse s'opère dans l'organisme des ruminants. Ils démontrent en outre que les premiers estomacs des polygastriques soumis à un régime insuffisant en vitamine B contiennent indifféremment ce facteur et qu'un des microorganismes dominants du rumen est capable de synthétiser la vitamine B *in vitro*. Wegner *et al.* (1940) démontrent finalement l'aptitude d'une génisse au rumen fistulé à synthétiser six substances du complexe B. Beaucoup de recherches ont aussi porté sur les constituants individuels du complexe B ; les résultats seront rapportés ultérieurement.

RÉFECTION

Nous avons vu précédemment que les fèces peuvent contenir des facteurs de croissance. On a identifié ces facteurs à la vitamine B. On a attribué la présence de cette vitamine à sa synthèse microbienne dans le tube digestif. En 1926, un concept singulier prend naissance, celui de la réfection spontanée.

Ce phénomène important et complexe est observé pour la première fois à l'Institut d'Hygiène de Copenhague par Fridericia (1926), qui constate que, parmi les rats soumis à un régime dépourvu de vitamine B, certains perdent spontanément tous les symptômes de carence en vitamine B et recouvrent une apparence normale sans recourir à la coprophagie ni recevoir de supplément vitaminique. Fridericia *et al.* (1927) étudient les particularités de cette condition, et proposent

d'appeler « réfection » le phénomène en vertu duquel des animaux sont capables de se nourrir, croître et se reproduire sans recevoir de vitamine B dans leur ration. Il leur faut donc déduire que la synthèse de la vitamine B s'opère dans l'organisme des animaux rétablis, car les fèces des rats guéris contiennent des quantités plus considérables de vitamine B que les excréments bruns des rats malades soumis au même régime. Lors de la réfection, les fèces deviennent blanches et volumineuses, contiennent des sels biliaires et beaucoup d'amylase. La couleur blanche est attribuée à la présence de grains intacts d'amidon portant des bactéries colorables en bleu par l'iode. Ces fèces peuvent se conserver à l'état sec pendant cinq mois et demi sans perdre leur pouvoir de réfection. L'agent de la réfection est non filtrable et se trouve dans le contenu caecal des rats rétablis. La réfection peut être transmise par ces fèces à d'autres jeunes rats. On interprète ce mécanisme comme la résultante d'un changement dans la flore intestinale.

Roscoe (1927) observe le même phénomène à l'Institut Lister, et relate que plusieurs rats recevant une diète pauvre en vitamine B se sont rétablis spontanément. La réfection semble toutefois impossible lorsque les glucides de la diète sont solubles. Selon Roscoe, l'amidon cru est nécessaire à la réfection.

Au Laboratoire Biochimique de Cambridge, Kon et Watchorn (1927) et Kon (1931) confirment le phénomène de Fridericia. Selon eux, l'amidon de pomme de terre possède un pouvoir de réfection plus grand que l'amidon de riz. La cuisson de l'amidon ou son extraction par l'alcool détruisent son action protectrice.

Ailleurs, Bliss et Green (1936) et Kelly et Parsons (1937) corroborent les résultats précédents relatifs à la supériorité de l'amidon cru de pomme de terre dans la réfection chez le rat.

Plusieurs chercheurs ont hésité à attacher quelque importance à cette singularité de la réfection soudaine. Cependant, elle a finalement engendré le concept que les vitamines, en plus d'être synthétisées dans la voie intestinale, peuvent être excrétées en quantités suffisamment grandes pour satisfaire aux exigences de l'animal coprophage.

ALIMENTATION VS SYNTHÈSE INTESTINALE

L'influence de l'alimentation sur la synthèse intestinale est un sujet d'étude ancien. Herter et Kendall (1909-10) reconnurent les premiers l'influence des glucides sur la prédominance des bactéries acidifiantes dans l'intestin. Rettger et Cheplin (1921) établirent une flore de lactobacilles dans le tube digestif d'animaux nourris d'une ration riche en lactose et pauvre en protéines. Mitchell (1927) découvrit aussi le rôle déterminant de la dextrine et de l'amidon sur la croissance des rats. Guerrant et Dutcher (1934) expliquèrent cette action par l'implantation intestinale de bactéries synthétisant les vitamines.

Influence des glucides, des lipides et des protides. Morgan *et al.* (1938) affirment que le lactose favorise la synthèse de la riboflavine et de la pyridoxine, tandis que l'amidon de maïs encourage la synthèse de l'acide pantothénique. Le sucrose est impuissant à promouvoir ces synthèses. Skeggs et Wright (1946) établissent aussi la supériorité de la dextrine sur les autres glucides dans la synthèse intestinale et l'emmagasiner de l'acide pantothénique. Elvehjem et Krehl (1947) insistent encore sur la supériorité de la dextrine, qui améliore la croissance des rats soumis à une ration purifiée. La teneur en vitamine B₃ du caecum, du foie et des muscles accuse une augmentation considérable. On attribue ce rôle favorable de la dextrine à sa dégradation et à son absorption lentes dans le tube digestif. Les sucres assimilables traversent la paroi dans la partie supérieure de l'appareil digestif et les microbes intestinaux en sont privés. La dextrine, au contraire, se dégrade lentement dans l'intestin, et les microbes synthétisants, que les monogastriques hébergent dans leur caecum surtout, peuvent proliférer et synthétiser (Johansson et Sarles, 1949 ; Najjar et Holt, 1945). Chez les polygastriques, la nature des glucides a une importance secondaire, car les microbes synthétisants occupent le rumen.

Les graisses exercent aussi une influence sur la flore synthétisante, mais leur rôle dépend de la nature des glucides (Boutwell *et al.*, 1945).

Influence des vitamines. Wegner *et al.* (1941) rapportent que l'addition de thiamine à la ration stimule, dans le rumen du veau, la synthèse de la riboflavine, de l'acide pantothénique et de la biotine. Une ration riche en acide pantothénique et en riboflavine encourage la synthèse de la biotine chez le rat (Nielsen et Elvehjem, 1942). Woolley (1942) obtient aussi une production plus considérable de biotine après l'addition d'acide pantothénique à la ration. De plus, les souris privées d'inositol recouvrent leur fourrure si un supplément de vitamine B₃ figure dans la ration ; les microbes synthétisant l'inositol ont donc besoin d'acide pantothénique (Woolley, 1941).

Plusieurs autres facteurs généraux conditionnent la biosynthèse intestinale des vitamines B (Johansson et Sarles, 1949 ; Najjar et Holt, 1945).

SYNTHÈSE DES VITAMINES PAR LES BACTÉRIES LACTIQUES

Les renseignements sur la synthèse des vitamines par les bactéries lactiques sont peu nombreux. Certains auteurs rapportent des résultats positifs. Gasser (1931) mentionne que le saya (lait fermenté oriental) est riche en vitamines A, B, C et D et qu'il est supérieur au kéfir, au yoghourt et au lait frais.

Selon Balsamelli (1938), *Bacillus bulgaricus* et un streptocoque lactique synthétisent la vitamine C en quantité réduite. L'effet de la culture sur le cobaye carencé serait, cependant, très net. Wegner *et al.* (1940) constatent que diverses souches de *Streptococcus lactis*, de levures et de lactobacilles Gram négatifs synthétisent certains facteurs du complexe B. Welch et Wright (1943) ainsi que

Najjar et Holt (1943, 1944) affirment également que des microorganismes semblables aux précédents, lorsqu'ils se rencontrent dans l'intestin des animaux et de l'homme, sont capables de synthétiser divers facteurs du complexe B.

D'après Chitre et Patwardhan (1945), la teneur en riboflavine du lait fermenté est plus élevée que celle du lait dont il provient. La teneur en thiamine n'est pas modifiée, alors que celle de l'acide nicotinique diminue légèrement. Goldberg (1946) rapporte aussi que la fermentation du lait entraîne une diminution de l'acide nicotinique.

Rao et Basu (1952) ont étudié l'effet de l'acidification du lait sur sa teneur en thiamine, en riboflavine et en acide nicotinique. Leurs résultats indiquent que *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus paracitrovorus*, en association, utilisent ces trois vitamines pour leur croissance dans le lait. Individuellement, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *S. cremoris* et *S. lactis* utilisent une partie de l'acide nicotinique du lait pour leur croissance. *S. cremoris* et *S. lactis* synthétisent de petites quantités de thiamine. Toutes les bactéries lactiques étudiées diminuent la teneur du lait en riboflavine, à l'exception de *S. cremoris*, qui ne la modifie pas.

Finalement, Nambudripad *et al.* (1956) rapportent des données intéressantes relatives à l'augmentation de la teneur en acides folinique et folique du lait pendant la formation du dahi (lait acide hindou), comme résultat des activités biosynthétiques de certaines espèces de bactéries lactiques. Ils constatent que, parmi les microorganismes à l'essai, *S. lactis* provoque le maximum de synthèse d'acide folique, suivi de *S. thermophilus*. *S. lactis* augmente la teneur des acides folinique et folique de 2.7 et 0.5 à 46 et 18 microgrammes/gramme respectivement. Si on incube le dahi pendant 7 jours, ces valeurs s'élèvent à 190 et 29 microgrammes/gramme respectivement. Les autres streptocoques ainsi que les lactobacilles ne provoquent aucune augmentation importante. Quand on emploie les cultures en mélange, on obtient des résultats similaires. Comme les lactobacilles prédominent généralement, ils entravent les activités synthétiques de *S. lactis* et de *S. thermophilus*.

SOMMAIRE

L'observation d'une étroite relation entre les activités biologiques des vitamines et la présence des microorganismes a suscité des recherches qui ont abouti à la découverte du phénomène de la biosynthèse des vitamines. Cette biosynthèse s'effectue *in vivo* et *in vitro*. On la rencontre dans le tube digestif de l'homme et des animaux, particulièrement des polygastriques. De nombreuses espèces microbiennes participent à cette synthèse qu'influence la nature des aliments. Divers travaux tendent à démontrer que les bactéries lactiques possèdent le pouvoir de synthétiser certaines vitamines, mais ce pouvoir semble limité.

BIBLIOGRAPHIE

- BALSAMELLI, F. 1938 Recherches sur la possibilité de synthèse du facteur C de la part du *B. bulgaricus* et du streptocoque lactique. Boll. sez. ital. soc. intern. microbiol., **10**, 145.
- BECHDEL, S. I., ECKLES, C. H., et PALMER, L. S. 1926 The vitamin B requirements of the calf. J. Dairy Sci., **9**, 409.
- BECHDEL, S. I., et HONEYWELL, H. E. 1927 The relation between the vitamin B content of the feed eaten and of the milk produced. J. Agr. Research, **35**, 283.
- BLISS, S., et GREEN, F. 1936 Refection in the rat. J. Nutrition, **11**, 1.
- BOTTOMLEY, W. B. 1914-1915 Some accessory factors in plant growth and nutrition. Proc. Roy. Soc. (London) B, **88**, 237.
- BOTTOMLEY, W. B. 1917 Some effects of organic growth-promoting substances (auximones) on the growth of *Lemna minor* in mineral culture solutions. Proc. Roy. Soc. (London) B, **89**, 481.
- BOUTWELL, R. K., GEYER, R. P., ELVEHJEM, C. A., et HART, E. B. 1945 Studies on the interrelation of fats, carbohydrates and B vitamins in rat nutrition. Arch. Biochem., **7**, 1943-157.
- CANTANI, A. J. R. 1901 Z. Hyg. Infektionskrankh., **36**, 29.
- CHITRE, R. G., et PATWARDHAN, V. N. 1945 Current Sci. (India), **14**, 321.
- COOPER, E. A. 1914 On the protective and curative properties of certain foodstuffs against polyneuritis indicated in birds by diet of polished rice. J. Hyg., **14**, 12.
- COOPER, E. A., et FUNK, C. 1911. Experiments on the causation of Beri-Beri. Lancet, **2**, 1266.
- COWGILL, G. R., DEUEL, H. J., Jr., et SMITH, A. H. 1925 Studies in the physiology of vitamins. III. Quantitative aspects of the relation between vitamin B and appetite in the dog. Am. J. Physiol., **63**, 106.
- DAMON, S. R. 1923 Some observations in regard to growth-promoting substances of bacterial origin. J. Biol. Chem., **56**, 841.
- DAMON, S. R. 1924 Acid-Fast bacteria as a source of vitamin B. J. Pathol. Bacteriol., **27**, 163.
- DUTCHER, R. A., et FRANCIS, E. 1923-1924 Vitamin studies. X. Feeding technique in vitamin studies. Proc. Soc. Exptl Biol. Med., **21**, 189.
- ELVEHJEM, C. A., et KREHL, W. H. 1947 Imbalance and dietary interrelationships in nutrition. J. Am. Med. Assoc., **135**, 279-287.
- FRIDERICIA, L. S. 1926 Refection, a transmissible change in the intestinal content, enabling rats to grow and thrive without vitamin B in the food. Skand. Arch. Physiol., **49**, 129.
- FRIDERICIA, L. S., FREUDENTHAL, P., CUDJONSSON, S., JOHANSEN, G., et SCHOUBYE, N. 1927 A transmissible change in the intestinal content, enabling rats to grow and thrive without vitamin B in the food. J. Hyg., **27**, 70.
- GASSER, E. 1931 Intern. Rev. Agr., **22**, 595.
- GOLDBERG, L. 1946 S. African J. Sci., **42**, 205.
- GUERRANT, N. B., et DUTCHER, R. A. 1934 Effect of type of carbohydrate on vitamins B and G potency of feces voided by rats. Proc. Soc. Exptl Biol. Med., **31**, 796-800.
- HELLER, V. G., McELROY, C. H., et GARLOCK, R. 1925 The effect of bacterial flora on the biological test for vitamin B. J. Biol. Chem., **65**, 255.
- HERTER, C. A., et KENDALL, A. I. 1909-1910. J. Biol. Chem., **7**, 203.
- JOHANSSON, K. R., et SARLES, W. B. 1949 Some considerations of the biological importance of intestinal microorganisms. Bacteriol. Revs, **13**, 25-46.

- JONES, M. 1917 Abstr. Bacteriol., 1, 43.
- KELLY, E., et PARSONS, H. T. 1937 Some quantitative studies on refection in the rat. J. Nutrition, 13, 453.
- KON, S. K. 1931 Potato starch and refection. J. Hyg., 31, 543.
- KON, S. K., et WATCHORN, E. 1927 Relation between the nature of carbohydrate in the diet and refection in rats. J. Hyg., 27, 321.
- METCHNIKOFF, E. 1901 Note sur l'influence des microbes dans le développement des têtards. Ann. inst. Pasteur, 15, 631.
- MITCHELL, H. S. 1927 Comparative physiological values of five carbohydrates, based on growth and fecal analysis. Am. J. Physiol., 79, 537-541.
- MORGAN, A. F., COOK, B. B., et DAVIDSON, H. G. 1938 Vitamin B₂ deficiencies as affected by dietary carbohydrate. J. Nutrition, 15, 27-43.
- NAJJAR, V. A., et HOLT, L. E. 1943 J. Am. Med. Assoc., 123, 683.
- NAJJAR, V. A., et HOLT, L. E. 1944 J. Am. Med. Assoc., 126, 357.
- NAJJAR, V. A., et HOLT, L. E. 1945 The synthesis of B vitamins by intestinal bacteria. Dans *Vitamins and Hormones*, 3. Academic Press, Inc., New York.
- NAMBUDRIPAD, H., LAXMINARAYANA, H., et IYA, K. K. 1956 Intern. Dairy Congr. Proc. 14th Congr., 1.
- NIELSEN, E., et ELVEHJEM, C. A. 1942 J. Biol. Chem., 145, 713.
- NUTTALL, G. H. F., et THIERFELDER, H. 1895 Z. physiol. Chem., 21, 109.
- OSBORNE, T. B., et MENDEL, L. B. 1911 Feeding experiments with isolated food substances. Elementary bacteria and nutrition. Carnegie Inst. Wash. Publ., No. 156, 61.
- PACINI, A. J. P., et RUSSELL, D. W. 1918 J. Biol. Chem., 34, 43.
- PASTEUR, L. 1885 Compt. rend. acad. méd., 100, 66.
- RAO R. V., et BASU, K. P. 1952 Effect of souring on thiamin, riboflavin and nicotinic acid content of milk. Indian J. Dairy Sci., 5, 1.
- RETTGER, L. F., et CHEPLIN, H. A. 1921 *Treatise on the transformation of the intestinal flora with special reference to the implantation of Bacillus acidophilus*. Yale University Press. New Haven, Conn.
- ROBERTSON, R. C. 1924a Food accessory factors (vitamins) in bacterial growth. VIII. Relation of substances formed by *B. coli* to the growth of yeast. J. Infectious Diseases, 34, 395.
- ROBERTSON, R. C. 1924b Food accessory factors (vitamins) in bacterial growth. IX. Growth of several common bacteria in a synthetic medium and relation of substances formed by them to the growth of yeast. J. Infectious Diseases, 35, 310.
- ROSCOE, M. H. 1927 Spontaneous curves in rats reared upon a diet devoid of vitamin B and antineuritic vitamin. J. Hyg., 27, 103.
- SALMON, W. D. 1925 Vitamin B in the excreta of rats on a diet low in this factor. J. Biol. Chem., 65, 457.
- SCHOTTELIUS, M. 1902 Arch. Hyg., 42, 48.
- SCHOTTELIUS, M. 1898 Arch. Hyg., 34, 210.
- SKEGGS, H. R., et WRIGHT, L. D. 1946 Vitamin B complex studies with diets differing in the carbohydrate component. J. Nutrition, 32, 375-386.
- SMITH, A. H., COWGILL, C. R., et CROLL, H. M. 1925 A note on the technique for studying vitamin B. J. Biol. Chem., 66, 15.
- STEENBOCK, H., SELL, M. T., et NELSON, E. M. 1923 A modified technique in the use of the rat for determination of vitamin B. J. Biol. Chem., 55, 399.

- THEILER, A., GREEN, H. H., et VILJOEN, P. R. 1915 A contribution to the study of deficiency diseases with special reference to the Lamsiekte problem in South Africa. S. African Direct. Vet. Res. Rept., 3-4, 7.
- THJOTTA, T. 1921 J. Exptl Med., 33, 763.
- WEGNER, M. I., BOOTH, A. M., ELVEHJEM, C. A., et HART, E. B. 1940 Rumen synthesis of the vitamin B complex. Proc. Soc. Exptl Biol. Med., 45, 769.
- WEGNER, M. I., BOOTH, A. M., ELVEHJEM, C. A., et HART, E. B. 1941 Rumen synthesis of the vitamin B complex on natural rations. Proc. Soc. Exptl Biol. Med., 47, 90-94.
- WELCH, A. D., et WRIGHT, L. D. 1943 J. Nutrition, 25, 555.
- WOOLLEY, D. W. 1941 Relationship of pantothenic acid and inositol to alopecia in mice. Proc. Soc. Exptl Biol. Med., 46, 565.
- WOOLLEY, D. W. 1942 J. Exptl Med., 75, 277.
- ZAJDEL, R., et FUNK, C. 1925 La synthèse des vitamines par les levures. Compt. rend. soc. biol., 92, 1527.
-

II

INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA TENEUR DU LAIT EN THIAMINE

THE EFFECT OF THE
LA TUBERIEUSE IN THE

II

INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA TENEUR DU LAIT EN THIAMINE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les observations rapportées antérieurement s'adressent surtout au pouvoir synthétique d'une bactérie particulière, cultivée en milieu carencé, ou à la biosynthèse intestinale des différents facteurs B chez certaines espèces animales. Nous allons maintenant résumer les notions acquises sur le rôle des différents groupes de microorganismes dans la biosynthèse de la thiamine.

Deux corps chimiques composent la thiamine : le thiazole et la pyrimidine. L'absence de thiamine ou l'incapacité de synthétiser cette vitamine ou l'une ou l'autre de ses fractions entravent la croissance. Il y a des microorganismes qui requièrent la thiamine dans leurs milieux de culture pour se développer. Par contre, certaines espèces la synthétisent totalement, d'autres forment l'un ou l'autre de ses constituants.

RÔLE DES PROTOZOAIRES

Lwoff (1939), dans une étude de la synthèse de la thiamine par *Acanthamoeba castellanii*, constate que cet organisme ne se développe en eau peptonée que si l'on inclut la pyrimidine dans le milieu. Le thiazole n'est pas nécessaire. L'amibe en réalise la synthèse ou en trouve suffisamment dans le milieu. Lorsque le milieu ne contient pas de thiamine, un cilié, *Glaucoma piriformis*, ne s'y développe pas, à moins que l'amibe ne s'y soit antérieurement multipliée. C'est une indication que *Acanthamoeba castellanii* réalise la synthèse de la thiamine. Il en est ainsi pour nombre d'autres espèces. Lwoff et Dusi (1937a, 1937b, 1937c, 1938) et Dusi (1939) le démontrent particulièrement avec *Polytomella coeca*, *Polytoma ocellatum*, *P. caudatum*, *P. obtusum*, *P. uvella*, *Chilomonas paramecium* et *Euglena pisciformis*. Ondratshek (1941) obtient des résultats semblables avec *Polytomella globosa* et *Polytoma ocellatum*.

Lwoff (1939) reconnaît que le pouvoir synthétique des trypanosomidés est d'autant plus faible que l'évolution biologique des formes est plus accentuée. La tendance à une dégradation physiologique lui apparaît comme la conséquence même de cette évolution.

RÔLE DES LEVURES

La plupart des levures semblent synthétiser plus ou moins rapidement la thiamine. Rappelons cependant que Robbins et Kavanagh (1938a, 1938b) mentionnent quelques espèces de torulas qui exigent cette vitamine.

RÔLE DES MOISSURES

Parmi les moisissures, il y en a qui ne synthétisent que la fraction thiazole. Mentionnons *Phytophthora fagopyri*, *Sclerotium delphina*, *S. rolfsii*, *Sphoerulina trifolii*, *Pythium polycladon*, *Pythium butleri* (Robbins et Kavanagh, 1938a, 1938b), *Melanospora destruens* (Hawker, 1939), *Cerastostomella microspora*, *C. montium*, *C. obscura*, *C. piciaperda* et *C. stenoscerus* (Robbins et Ma, 1943). Selon Kavanagh (1942), *Mucor ramannianus* synthétise la pyrimidine et non le thiazole. *Neurospora crassa* (Woolley et White, 1943 ; Tatum et Belle, 1946), *Absidia glauca* (Robbins et Kavanagh, 1938a, 1938b), *Zygorhynchus exponens*, *Rhizopus nigricans*, *Thamnidium elegans*, *Choetostylum fresenii*, *Pilaira anomala*, *Aspergillus niger* (Bonner, 1937) et nombre d'autres moisissures synthétisent simultanément les fractions pyrimidine et thiazole de la thiamine.

RÔLE DES BACTÉRIES

La découverte des bactéries autotrophiques par Winogradsky (1889) déclencha l'étude de la nutrition des microorganismes. Depuis, on a identifié un grand nombre de bactéries capables d'édifier pour leurs besoins des substances nécessaires à la croissance. En les plaçant dans des conditions particulières, on peut même amener certaines bactéries à synthétiser la thiamine.

Par une série de cultures dans un milieu au sulfate d'ammonium ne contenant que de l'extrait de levures comme stimulant, Wood *et al.* (1938) entraînent une souche de *Propionibacterium pentosaceum* à croître aussi bien en absence qu'en présence de thiamine. D'autre part, dans une étude sur les exigences de *Rhizobium trifolii*, West et Wilson (1938a, 1938b) révèlent que les ensemencements répétés de cet organisme dans un milieu purifié l'amènent à synthétiser jusqu'à 19.6 microgrammes de thiamine par gramme. Pour faire suite à ces découvertes, Silverman et Werkman (1939) entreprennent de vérifier si *Propionibacterium pentosaceum* peut réellement acquérir la capacité de synthétiser la thiamine ou s'il se produit simplement une modification dans son métabolisme. Comme résultat, les cellules entraînées produisent 6.25 microgrammes de thiamine par gramme de cellules sèches et les cellules non entraînées 0.4 microgramme seulement.

Parmi les bactéries dont on a démontré la capacité de synthétiser la thiamine, mentionnons le bacille de Pfeiffer (Damon, 1923), *Bacillus vulgatus* (Weill *et al.*, 1922 ; Scheunert et Schieblich, 1923 ; Guha, 1932 ; Burkholder et McVeigh, 1942), *Bacillus subtilis* (Robertson, 1924a ; Sunderlin et Werkman, 1928 ; Knight, 1937), *Bacillus proteus* (Robertson, 1924b ; Sunderlin et Werkman, 1928), *Bacillus adhaerens* et *Bacillus lactis aerogenes* (Sunderlin et Werkman, 1928), *Bacillus alcaligenes fecalis* (Sunderlin et Werkman, 1928 ; Schieblich, 1933 ; Burkholder et McVeigh, 1942), *Bacillus mesentericus* (Burkholder et McVeigh, 1942), *Bacillus bifidus* (Reichelt, 1935, 1939), *Corynebacterium diphtheriae* (Evans *et al.* 1939), *Pseudomonas fluorescens* et *Proteus vulgaris* (Thompson, 1942), *Pseudomonas aeruginosa*, *Eberthella typhosa* et *Serratia marcescens* (Knight, 1937), quelques organismes de la dysenterie (Dorfman *et al.*, 1939), *Clostridium butylicum* (Thompson, 1942 ; Woolley et White, 1943), *Escherichia coli*, (Kuroya et Hosoya, 1923 ; Robertson, 1924b ; Sunderlin et Werkman, 1928 ; Burkholder et McVeigh, 1942 ; Woolley et White, 1943 ; Genung et Lee, 1944), *Staphylococcus flavus* (Leonian et Lilly, 1942), diverses souches de bactéries acidopropioniques (Tatum *et al.*, 1936 ; Wood *et al.*, 1938 ; Silverman et Werkman, 1939), *Propionibacterium pentosaceum* (Wood *et al.*, 1938 ; Woolley et White, 1943), diverses variétés de bactéries acido-lactiques (Moller, 1938 ; Moller *et al.*, 1939 ; Wood *et al.*, 1940), *Lactobacillus arabinosus*, *L. casei*, *L. delbruckii*, *L. mesenteroides*, *L. pentoaceticus*, *Streptococcus lactis* R., *S. hemolyticus*, (Woolley et White, 1943), *Rhizobium trifolii* (West et Wilson, 1938a, 1938b, 1939).

Quelle que soit la fréquence de la synthèse bactérienne de la thiamine, les différentes espèces peuvent varier considérablement dans leur pouvoir synthétique. Ces variations peuvent expliquer des résultats parfois contradictoires. Ainsi, le pouvoir synthétique d'*Escherichia coli* n'a pu être démontré par Cooper (1914), Damon (1921), Eijkman et Derks (1922), alors que Kuroya et Hosoya (1923), Robertson (1924a, 1924b), Sunderlin et Werkman (1928), Burkholder et McVeigh (1942), Genung et Lee (1944) ont obtenu des résultats positifs.

BIOSYNTHESE INTESTINALE

Comme les bactéries possèdent un pouvoir synthétique considérable, il y a lieu de se demander si une partie des exigences animales en thiamine ne peuvent être comblées par la flore intestinale. Cependant, la facilité de provoquer l'athiaminose chez plusieurs espèces animales laisse croire que la synthèse intestinale de la thiamine ne se produit pas toujours ou ne se produit qu'en quantité insuffisante, ou que la vitamine n'est pas totalement absorbée.

À la suite de leurs recherches sur la cause du béri-béri, Cooper et Funk (1911) constatent que les régimes à base de divers glucides purs (amidon, inuline, sucrose, dextrine) provoquent la polynévrite avec les symptômes usuels. Peu après, Cooper (1914) démontre que les extraits alcooliques d'excréments de poules nourries au grain non poli et ceux de lapins recevant du pain et du chou guérissent la

polynévrite du pigeon. Il émet l'hypothèse qu'une certaine quantité de substances antinévritiques des fèces provient de la biosynthèse intestinale. Salmon (1925) observe aussi certaines irrégularités dans ses résultats en étudiant l'effet de la graine Velvet sur la croissance des rats. Il rapporte que les excréments des rats contiennent plus de thiamine que les aliments ingérés.

L'hypothèse de la biosynthèse intestinale est confirmée plus tard par Roscoe (1931), Guarrant et Dutcher (1932, 1934), Guarrant *et al.* (1935), Whipple et Church (1935), Griffith (1935a), Leong (1937) et Guarrant *et al.* (1937). Griffith (1935b) signale que la thiamine synthétisée dans le caecum du rat n'est utilisée que si l'animal a recours à la coprophagie. Autrement, il épuise promptement ses réserves en thiamine.

Abdel-Salaam et Leong (1938) cultivent les bactéries intestinales du rat sur milieux de laboratoire pour en déterminer le pouvoir synthétique. Les cultures d'un jour sont les plus puissantes. Elles forment jusqu'à 16 U.I. de thiamine par gramme. Après trois jours d'incubation, les auteurs notent une destruction de la vitamine. Ils l'attribuent à la température d'incubation (37 C) et à l'alcalinité croissante des milieux de culture, conséquence du métabolisme bactérien. Ils constatent en outre que la thiamine synthétisée par les bactéries ne diffuse pas dans le milieu environnant. Cette observation peut expliquer les cas d'athiaminose qui se constatent chez le rat en dépit de la synthèse intestinale.

BIOSYNTHESE CHEZ LES RUMINANTS

Signalée pour la première fois par Theiler *et al.* (1915), la synthèse des vitamines chez les ruminants a donné lieu à d'intenses recherches. Bechdel *et al.* (1928) constatent que le contenu fermenté du rumen contient plus de vitamine B que les aliments ingérés. Ces chercheurs décident d'étudier la nature de la flore du rumen. Ils identifient une bactérie de l'espèce *Flavobacterium vitarumen*, qui prédomine à 90%. L'addition de cette bactérie morte à une ration dépourvue de vitamine B provoque une meilleure croissance chez le rat. Ils concluent à la synthèse de la vitamine dans le rumen par *Flavobacterium vitarumen*.

Wegner *et al.* (1940) découvrent qu'une génisse peut synthétiser des quantités appréciables de thiamine. McElroy et Goss (1941) étudient de façon spéciale la synthèse de la thiamine dans le rumen. Ils constatent que le contenu en thiamine du rumen et du réticulum chez quatre moutons soumis pendant trente jours à une ration insuffisante en cette vitamine (0.4 μ g par gramme) est de 7 μ g par gramme de matière sèche. Une expérience similaire faite sur deux vaches fistulées ne révèle pas de thiamine en quantité appréciable dans le rumen, mais le lait de l'une d'elles contient de 2 à 2.5 μ g de thiamine par gramme de matière sèche. Cependant, les auteurs rencontrent de la thiamine dans le rumen d'une vache non fistulée soumise aux mêmes conditions. Ces résultats confirment les travaux des premiers investigateurs et indiquent que la thiamine n'est pas un

élément essentiel de la ration des ruminants. Par ailleurs, Hunt *et al.* (1941) font remarquer que la teneur en thiamine augmente dans le rumen quatre heures après l'ingestion des aliments, puis diminue douze à seize heures plus tard.

Des observations précédentes, on peut conclure que la formation de la thiamine dans le rumen est un fait prouvé. Les ruminants peuvent utiliser la vitamine synthétisée plus facilement que les autres animaux, probablement à cause de l'emplacement favorable du siège principal de la synthèse.

BIOSYNTHÈSE CHEZ L'HOMME

Najjar et Holt (1943, 1944) s'intéressent particulièrement au problème de la biosynthèse de la thiamine chez l'homme. Ces investigateurs soumettent neuf garçons de 16 à 23 ans à un régime pauvre en thiamine. Ce régime comprend de la caséine, du « Crisco », du dextri-maltose, un mélange minéral et un mélange de vitamines cristallisées dont la teneur en thiamine est graduellement diminuée. Des ingestions aussi minimales que 0.1 et 0.3 mg de thiamine par jour ne provoquent aucun malaise. Lorsque la thiamine est supprimée, quatre des neuf sujets manifestent de la névrite en trois à cinq semaines ; celle-ci s'accompagne d'oedème, de perte d'appétit et parfois de vomissement. Quatre sujets demeurent normaux durant les sept semaines d'observation. La quantité de thiamine libre synthétisée dans les fèces semble avoir une relation définie avec la présence ou l'absence de symptômes. Dans presque tous les cas, la thiamine totale excrétée, tant dans l'urine que dans les fèces, dépasse la quantité ingérée. La sulfothérapie confirme la biosynthèse de la thiamine. Elle réduit l'excrétion fécale de la vitamine B₁ de 27-52 μ g par jour à 0 μ g. Selon ces auteurs, la thiamine libre est absorbée dans le gros intestin dans une large mesure. Des lavements contenant 50 mg de thiamine B₁ augmentent l'excrétion urinaire.

Plus récemment, Alexander et Landivehr (1945) démontrent que la thiamine et la cocarboxylase des fèces humaines ne sont d'aucune valeur nutritive pour l'individu, puisqu'elles semblent localisées en majeure partie dans les microorganismes de la flore fécale. Ils infirment ainsi les observations de Najjar et Holt (1943, 1944) relatives à l'absorption de la thiamine dans le gros intestin. Ils basent leurs assertions sur l'administration de lavements contenant des quantités physiologiques de thiamine. Non seulement l'excrétion urinaire de la vitamine n'augmente pas, mais toute la thiamine et la cocarboxylase administrées sont récupérées dans les fèces vingt-quatre heures après le traitement.

SOMMAIRE

De nombreux microorganismes ont la propriété de synthétiser la thiamine ou l'une ou l'autre de ses fractions. Cependant, la spécificité de ce facteur vitaminique et les variations biologiques des microorganismes sont parfois causes de divergences dans les résultats.

D'autres microorganismes ont besoin de thiamine pour leur développement. Quand ces derniers se multiplient dans des milieux dépourvus de vitamine B₁, ils peuvent parfois acquérir la propriété d'en former.

Certaines bactéries intestinales synthétisent la thiamine. Son utilisation varie avec la localisation de la synthèse dans l'organisme. Ainsi, les ruminants n'ont généralement pas besoin d'ingérer de thiamine, parce que le siège principal de la synthèse est le rumen, ce qui favorise une absorption adéquate. Par ailleurs, chez les monogastriques, la thiamine synthétisée ne semble pas suffisamment absorbée pour satisfaire les besoins de l'organisme.

Plusieurs facteurs influencent le degré de biosynthèse intestinale. Il peut se trouver dans l'intestin des espèces bactériennes capables de détruire soit les microorganismes utiles, soit la vitamine formée. Les sulfamidés ont une action bactériostatique sur les bactéries synthétisantes. Les constituants du régime alimentaire semble aussi jouer un rôle considérable.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE L'INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA TENEUR DU LAIT EN THIAMINE*

On a rapporté que plusieurs espèces de bactéries lactiques synthétisent la thiamine dans des conditions spéciales. Woolley et White (1943), en particulier, constatent que *Lactobacillus arabinosus*, *L. casei*, *L. delbruckii*, *L. mesenteroides*, *L. pentoaceticus*, *Streptococcus lactis* R, *S. hemolyticus* et *Propionibacterium pentosaceum* manifestent cette propriété.

Les tentatives d'utiliser les bactéries lactiques comme source de vitamine B chez certaines espèces animales n'ont pas été très concluantes. Wollman et Vagliano (1922) ont essayé de nourrir des rats avec du laitensemencé de bacilles bulgares sans résultats apparents. Plus tard, Lecoq et Villette (1935) ont rapporté que l'introduction de *Bacillus bulgaricus* à raison d'un milliard par gramme dans une ration contenant 66% de saccharose ne semble pas constituer une source appréciable de vitamine B chez les pigeons. Au contraire, *Bacillus bulgaricus* favorise chez eux l'évolution du polynévritisme. Selon toute probabilité, la forte proportion de saccharose dans la ration a joué un rôle important dans la manifestation de l'athiaminose.

Les travaux concernant le sort de la thiamine dans les produits laitiers sont plutôt rares. Toutefois, Evans *et al.* (1946) observent une diminution progressive de la teneur en thiamine du fromage Cheddar. La maturation à 58 F causerait de plus grandes diminutions qu'à 40 F. La pasteurisation lente du lait destiné à la fabrication du fromage atténuerait cette perte.

Par ailleurs, les renseignements sur la biosynthèse de la thiamine par les diverses espèces de bactéries lactiques étudiées individuellement dans le lait semblent inexistantes. Le rôle important que jouent les produits laitiers dans

* Travail exécuté en 1948-49.

l'équilibre d'un régime, particulièrement en ce qui concerne les vitamines, nous a incités à étudier ce pouvoir chez dix espèces et quelques associations ou symbioses de bactéries lactiques placées dans des conditions naturelles. En conséquence, le but de cette étude expérimentale est de déterminer l'influence des bactéries lactiques sur la teneur du lait en thiamine.

Afin de connaître la marche de la fermentation lactique, nous avons effectué, parallèlement aux déterminations de la thiamine, des titrations de l'acidité totale.

Comme Sure et Ford (1943) rapportent que l'incubation du lait de vache à 37 C produit une destruction partielle de la thiamine, nous avons considéré cette influence aux températures de 41 C et de 20 C.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La thiamine a été déterminée par fluorométrie à l'aide du fluoromètre photo-électrique Coleman, modèle 12A. Nous avons employé, avec de légères modifications, la méthode de Hennessy et Cerecedo (1939) simplifiée par Hodson (1945).

Cultures bactériennes. Le lait destiné aux expériences est écrémé, pasteurisé au bain-marie pendant 10 minutes à 95 C, refroidi à la température d'incubation, puis réparti en portions de 100 ml dans des flacons Erlenmeyer stériles de 125 ml.

Des cultures rajeunies ont servi à l'inoculation. Les flacons de lait pasteurisé sont inoculés avec 2% de cultures. L'action bactérienne est paralysée dans les témoins par l'addition de 0.5% de chloroforme. Les flacons de lait ainsi inoculés sont placés à l'incubateur à 41 C dans le cas des bactéries thermophiles, à 31 C ou à 20 C dans le cas des espèces mésophiles. Les flacons de lait sont retirés de l'incubateur avec leurs témoins à mesure que le lait coagule dans les cultures non chloroformées et conservés à la température de la chambre jusqu'à la fin de l'expérience.

Nos essais ont porté sur trois souches de chacune des espèces suivantes : *Thermobacterium yoghourtii*, *Tbm bulgaricum*, *Tbm acidophilum*, *Streptococcus thermophilus*, *S. paracitrovorus*, *S. cremoris*, *S. lactis*, *S. liquefaciens*, *Lactobacillus casei* et *Propionibacterium shermanii*. Nous avons également étudié le yoghourt produit par la croissance dans le lait de *Thermobacterium yoghourtii*, *Tbm bulgaricum* et *Streptococcus thermophilus* ainsi que le kéfir obtenu par la fermentation du lait par *Streptococcus kefir*, *Lactobacillus casei*, *L. Caucasicus*, *Saccharomyces fragilis* et *Torula kefir*.

Réactifs. Solution-mère de sulfate de quinine contenant 10 mg de sulfate de quinine par litre d'acide sulfurique N/10; solution diluée de sulfate de quinine préparée en mélangeant 3 ml de la solution concentrée à 100 ml d'acide sulfurique N/10; solution-mère d'hydrochlorure de thiamine contenant 10 mg

d'hydrochlorure de thiamine par litre d'alcool à 20% (pH de 3.5 à 4.5); solution d'hydroxyde de sodium à 15%; solution de ferricyanure de potassium à 1%; solution d'acide trichloracétique à 2%; isobutanol redistillé.

Préparation de l'extrait. 10 ml de lait bien mélangé sont déposés dans un flacon volumétrique de 50 ml. Pour libérer la thiamine conjuguée, 50 mg de clarase sont ajoutés au lait sous forme de solution à 0.6%, le pH est ajusté à 4.0 - 4.5 et les flacons sont placés à l'incubateur à 50 C pendant 3 heures. Dans le but de briser le caillé, les flacons sont agités occasionnellement durant l'incubation. Les flacons sont alors refroidis et leur contenu dilué à 50 ml avec une solution d'acide trichloracétique à 2%. Les flacons sont agités vigoureusement et le mélange est filtré à travers un papier filtre Whatman No 1.

Préparation du thiochrome. Une aliquote de 5 ml de chaque flacon est distribuée dans 3 flacons Erlenmeyer de 125 ml identifiés 1, 2 et 3. 1 ml d'une solution contenant exactement 1 μ g d'hydrochlorure de thiamine est ajouté au flacon 2. 3 ml d'hydroxyde de sodium à 15%, contenant exactement 0.1 ml d'une solution de ferricyanure de potassium à 1.0%, sont ajoutés aux mélanges des flacons 1 et 2. 13 ml d'isobutanol redistillé sont ajoutés aux mélanges des trois flacons. Enfin, 3 ml d'une solution à 15% d'hydroxyde de sodium sont ajoutés au mélange du flacon 3.

Les flacons sont ensuite vigoureusement agités pendant 1.5 minute; leur contenu est transvasé dans des tubes à centrifugation et centrifugé pendant 1 minute à 900 rpm. Le dépôt aqueux est rejeté et la solution d'isobutanol déshydratée avec une petite quantité de sulfate de sodium anhydre et centrifugée de nouveau.

Acidité. L'acidité totale est déterminée par titrimétrie au moyen d'une solution d'hydroxyde de sodium N/10, en présence de phénolphtaléine comme indicateur. Des prélèvements de 9 ml ont servi aux titrations. Les résultats sont exprimés en degrés Dornic d'acidité.

RÉSULTATS

Les résultats sont rapportés dans les Tableaux I-1 à I-12 et illustrés dans les figures I-1 à I-4.

TABLEAU I-1

*Influence de Thermobacterium yoghourtii
sur la teneur du lait en thiamine*

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE THIAMINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSUM- MATION
I	0	15	15	0.3659	0.3659		
	24 hrs	15	146	0.3333	0.2640	0.0326	0.0693
	48 hrs	15	178	0.2656	0.2969	0.1003	-0.0313
	1 sem.	15	180	0.2642	0.1020	0.1017	0.1622
Ic	0	15	15	0.3770	0.3770		
	24 hrs	15	180	0.3252	0.3103	0.0518	0.0149
	48 hrs	15	180	0.2500	0.3279	0.1270	-0.0779
	1 sem.	15	180	0.2453	0.2157	0.1317	0.0296
Id	0	15	15	0.3770	0.3770		
	24 hrs	15	150	0.3585	0.2931	0.0185	0.0654
	48 hrs	15	179	0.2712	0.3250	0.1058	-0.0538
	1 sem.	15	180	0.2407	0.1887	0.1363	0.0520

TABLEAU I-2

*Influence de Thermobacterium bulgaricum
sur la teneur du lait en thiamine*

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE THIAMINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSUM- MATION
2b	0	22	22	0.3077	0.3077		
	24 hrs	22	203	0.2832	0.2362	0.0245	0.0470
	48 hrs	22	207	0.2295	0.2449	0.0782	-0.0154
	1 sem.	22	224	0.3623	0.3115	-0.0546	0.0508
2c	0	23	23	0.2917	0.2917		
	24 hrs	23	206	0.3530	0.2600	-0.0613	0.0930
	48 hrs	23	206	0.2727	0.2200	0.0190	0.0527
	1 sem.	23	212	0.3231	0.2481	-0.0314	0.0750
2d	0	23	23	0.3600	0.3600		
	24 hrs	23	206	0.3036	0.1774	0.0564	0.1262
	48 hrs	23	206	0.2778	0.2553	0.0822	0.0225
	1 sem.	23	221	0.3438	0.3448	0.0162	-0.0010

TABLEAU I-3
*Influence de Thermobacterium acidophilum
sur la teneur du lait en thiamine*

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE THIAMINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSUM- MATION
7	0	19	19	0.4167	0.4167		
	24 hrs	20	57	0.3500	0.3333	0.0667	0.0167
	48 hrs	20	68	0.3833	0.3333	0.0334	0.0500
	1 sem.	20	100	0.3833	0.3667	0.0334	0.0166
7c	0	19	19	0.4167	0.4167		
	24 hrs	20	56	0.3500	0.3333	0.0667	0.0167
	48 hrs	20	68	0.3667	0.3500	0.0500	0.0167
	1 sem.	20	99	0.3500	0.3667	0.0667	-0.0167
7d	0	19	19	0.4167	0.4167		
	24 hrs	20	55	0.3500	0.2833	0.0667	0.0667
	48 hrs	20	67	0.3500	0.3500	0.0667	0.0000
	1 sem.	20	96	0.3000	0.2833	0.1167	0.0167

TABLEAU I-4
*Influence de Streptococcus thermophilus
sur la teneur du lait en thiamine*

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE THIAMINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSUM- MATION
4	0	20	20	0.3226	0.3226		
	24 hrs	24	80	0.3582	0.2714	-0.0356	0.0868
	48 hrs	24	85	0.1833	0.1637	0.1393	0.0196
	1 sem.	24	90	0.2273	0.1864	0.0953	0.0409
4a	0	20	20	0.3016	0.3016		
	24 hrs	22	74	0.3433	0.3016	-0.0417	0.0417
	48 hrs	22	84	0.1930	0.1637	0.1086	0.0293
	1 sem.	22	90	0.2667	0.1864	0.0349	0.0803
4b	0	20	20	0.3100	0.3100		
	24 hrs	22	83	0.3182	0.3934	-0.0082	-0.0752
	48 hrs	22	87	0.2692	0.1607	0.0408	0.1085
	1 sem.	22	93	0.2333	0.1639	0.0767	0.0694

TABLEAU I-5

*Influence de Streptococcus paracitrovorus
sur la teneur du lait en thiamine*

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE THIAMINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSUM- MATION
5a	0	19	19	0.4167	0.4167		
	24 hrs	20	78	0.4000	0.2525	0.0167	0.1475
	48 hrs	22	82	0.3667	0.2000	0.0500	0.1667
	1 sem.	22	82	0.3833	0.1667	0.0334	0.2166
5b	0	19	19	0.4167	0.4167		
	24 hrs	20	80	0.4167	0.2167	0.0000	0.2000
	48 hrs	21	83	0.3333	0.1515	0.0834	0.1818
	1 sem.	22	85	0.3167	0.1667	0.1000	0.1500
5d	0	19	19	0.4167	0.4167		
	24 hrs	20	80	0.4167	0.1667	0.0000	0.3000
	48 hrs	22	83	0.3333	0.2333	0.0834	0.1000
	1 sem.	22	85	0.3333	0.2167	0.0834	0.1166

TABLEAU I-6

*Influence de Streptococcus cremoris
sur la teneur du lait en thiamine*

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE THIAMINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSUM- MATION
6b	0	20	20	0.3818	0.3818		
	24 hrs	46	76	0.2124	0.2321	0.1694	-0.0197
	48 hrs	50	86	0.2523	0.1791	0.1295	0.0732
	1 sem.	53	86	0.2321	0.1538	0.1497	0.0783
6c	0	19	19	0.2833	0.2833		
	24 hrs	34	67	0.3385	0.2000	-0.0552	0.1385
	48 hrs	34	83	0.3200	0.1774	-0.0367	0.1426
	1 sem.	36	84	0.3176	0.1569	-0.0343	0.1607
6d	0	19	19	0.3750	0.3750		
	24 hrs	30	36	0.3518	0.2252	0.1232	0.1266
	48 hrs	30	70	0.3175	0.0758	0.0575	0.2417
	1 sem.	30	91	0.3200	0.2368	0.0550	0.0832

TABLEAU I-7

*Influence de Streptococcus lactis
sur la teneur du lait en thiamine*

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE THIAMINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSOM- MATION
10a	0	20	20	0.3061	0.3061		
	24 hrs	28	44	0.3016	0.1667	0.0045	0.1349
	48 hrs	32	75	0.2424	0.1923	0.0637	0.0501
	1 sem.	36	94	0.3000	0.1719	0.0061	0.1281
10b	0	20	20	0.3279	0.3279		
	24 hrs	26	42	0.3616	0.2000	-0.0337	0.1616
	48 hrs	28	76	0.2742	0.1923	0.0537	0.0819
	1 sem.	35	90	0.2857	0.1719	0.0422	0.1138
10c	0	20	20	0.3115	0.3115		
	24 hrs	27	42	0.4310	0.1818	-0.1195	0.2492
	48 hrs	28	77	0.2830	0.2419	0.0285	0.0411
	1 sem.	33	89	0.3125	0.1818	-0.0010	0.1307

TABLEAU I-8

*Influence de Streptococcus liquefaciens
sur la teneur du lait en thiamine*

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE THIAMINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSOM- MATION
16a	0	20	20	0.2385	0.2385		
	24 hrs	22	60	0.2727	0.1364	-0.0342	0.1363
	48 hrs	25	82	0.2206	0.1269	0.0179	0.0937
	1 sem.	29	110	0.2273	0.1364	0.0112	0.0909
18	0	20	20	0.2385	0.2385		
	24 hrs	21	65	0.2575	0.2059	-0.0190	0.0516
	48 hrs	21	96	0.2132	0.1769	0.0253	0.0363
	1 sem.	24	100	0.2385	0.1791	0.0000	0.0594
18a	0	20	20	0.2578	0.2578		
	24 hrs	25	65	0.2812	0.2059	-0.0234	0.0753
	48 hrs	29	86	0.2273	0.1953	0.0305	0.0320
	1 sem.	31	98	0.2273	0.1818	0.0305	0.0455

TABLEAU I-9

*Influence de Lactobacillus casei
sur la teneur du lait en thiamine*

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE THIAMINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSUM- MATION
8	0	21	21	0.3929	0.3929		
	24 hrs	21	51	0.3456	0.3438	0.0473	0.0018
	48 hrs	21	68	0.3554	0.2691	0.0375	0.0863
	1 sem.	21	118	0.3281	0.0908	0.0648	0.2373
8a	0	21	21	0.3103	0.3103		
	24 hrs	21	50	0.3636	0.3115	-0.0533	0.0521
	48 hrs	21	72	0.3281	0.3137	-0.0178	0.0144
	1 sem.	21	123	0.2462	0.1250	0.0641	0.1212
8b	0	20	20	0.3805	0.3805		
	24 hrs	20	54	0.3636	0.3030	0.0169	0.0606
	48 hrs	20	72	0.3390	0.2710	0.0415	0.0680
	1 sem.	20	124	0.2239	0.1696	0.1566	0.0543

TABLEAU I-10

*Influence de Propionibacterium shermanii
sur la teneur du lait en thiamine*

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE THIAMINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSUM- MATION
9a	0	19	19	0.4167	0.4167		
	24 hrs	23	72	0.3000	0.2000	0.1167	0.1000
	48 hrs	23	79	0.3000	0.2667	0.1167	0.0333
	1 sem.	23	90	0.2833	0.1833	0.1334	0.1000
9b	0	19	19	0.4167	0.4167		
	24 hrs	30	60	0.3667	0.1333	0.0500	0.2334
	48 hrs	31	76	0.3667	0.2167	0.0500	0.1500
	1 sem.	35	114	0.2833	0.2000	0.1334	0.0833
9g	0	19	19	0.4167	0.4167		
	24 hrs	27	60	0.3333	0.1833	0.1834	0.1500
	48 hrs	29	77	0.3500	0.2167	0.0667	0.1333
	1 sem.	35	97	0.3333	0.2333	0.0834	0.1000

TABLEAU I-11
Influence des bactéries du yoghourt*
sur la teneur du lait en thiamine

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE THIAMINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSOM- MATION
B	0	15	15	0.4091	0.4091		
	24 hrs	16	97	0.3333	0.2121	0.0758	0.1212
	48 hrs	16	110	0.3333	0.2727	0.0758	0.0606
	1 sem.	20	150	0.3636	0.2273	0.0455	0.1363
Da	0	15	15	0.4091	0.4091		
	24 hrs	16	96	0.3788	0.2121	0.0303	0.1667
	48 hrs	16	108	0.2727	0.2878	0.1364	-0.0151
	1 sem.	20	146	0.3333	0.2273	0.0758	0.1060
De	0	15	15	0.4091	0.4091		
	24 hrs	16	100	0.3939	0.2121	0.0152	0.1818
	48 hrs	16	110	0.4091	0.2273	0.0000	0.1818
	1 sem.	19	149	0.3182	0.2121	0.0909	0.1061

**Thermobacterium bulgaricum*, *Thermobacterium acidophilum*, *Thermobacterium yoghourtii*, *Streptococcus thermophilus*.

TABLEAU I-12
Influence des microorganismes du kéfir*
sur la teneur du lait en thiamine

SOUCHE	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE THIAMINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSOM- MATION
	0	20	20	0.3637	0.3637		
	24 hrs	20	110	0.2031	0.1452	0.1606	0.0579
	48 hrs	20	110	0.3175	0.2344	0.0462	0.0831
	1 sem.	20	143	0.2879	0.2273	0.0758	0.0606

**Streptococcus kefir*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus caucasicus*, *Saccharomyces fragilis*, *Torula kefir*.

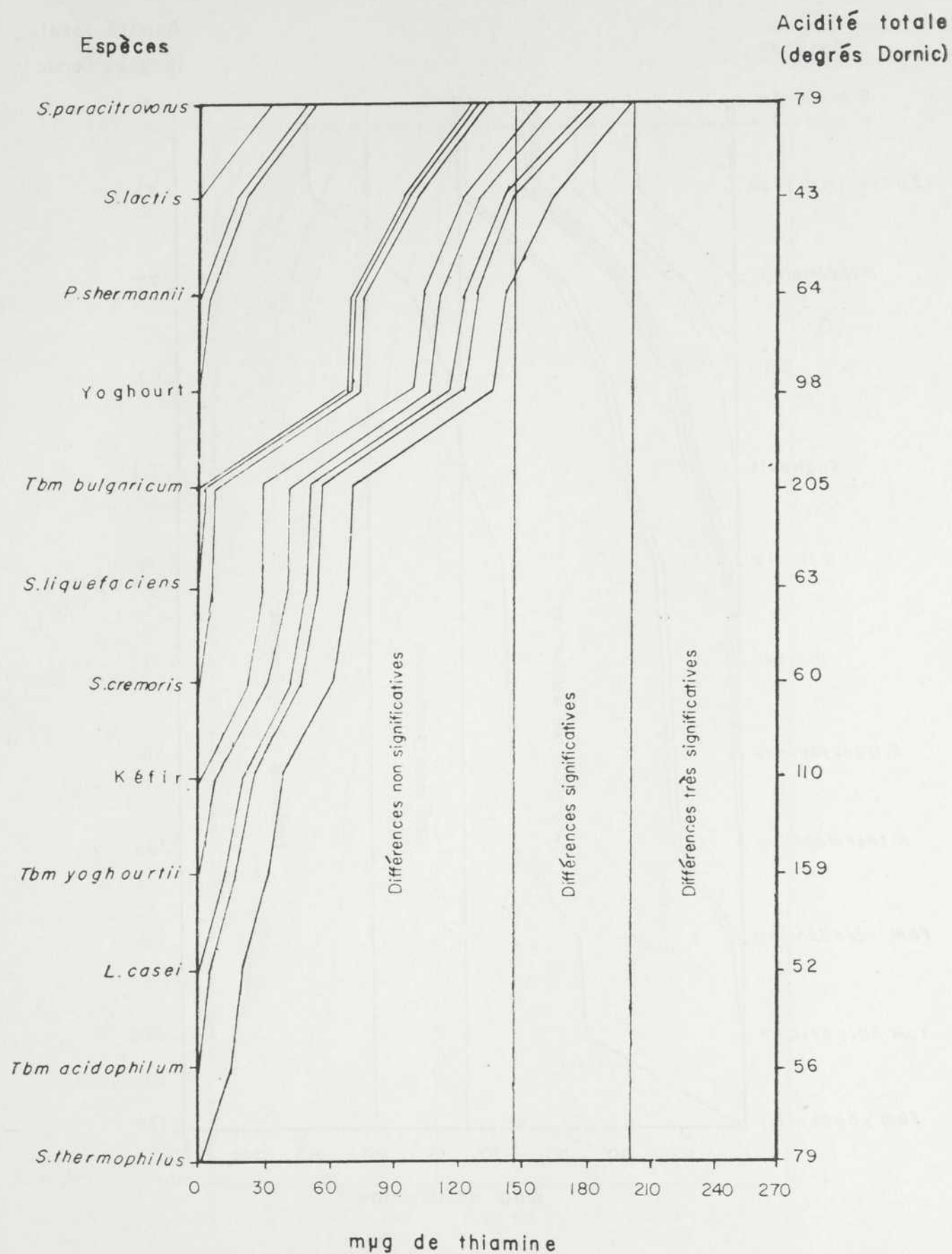


Figure I-1. Consommation de thiamine par ml de lait et acidité totale après 24 heures d'incubation.

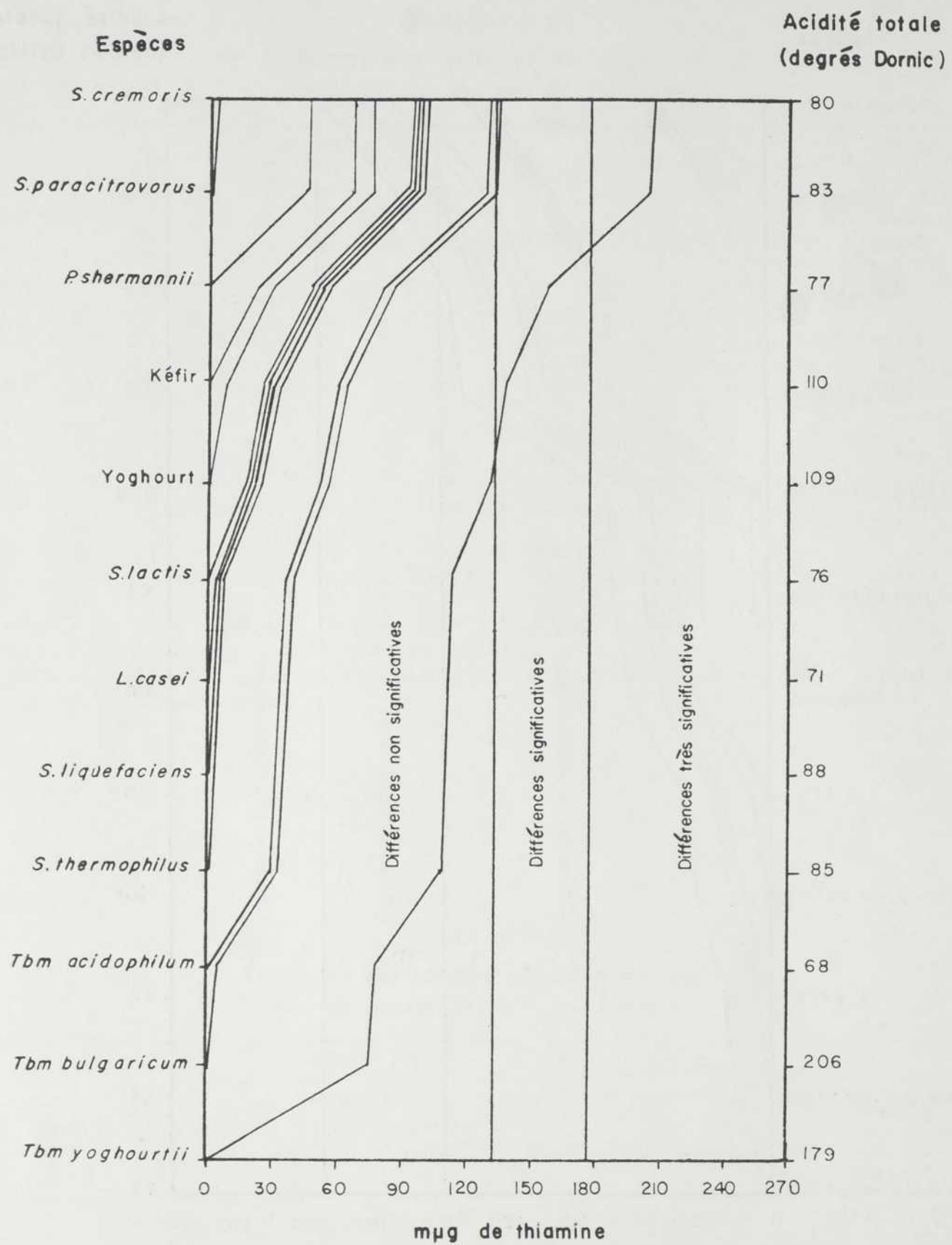


Figure I-2. Consommation de thiamine par ml de lait et acidité totale après 48 heures d'incubation.

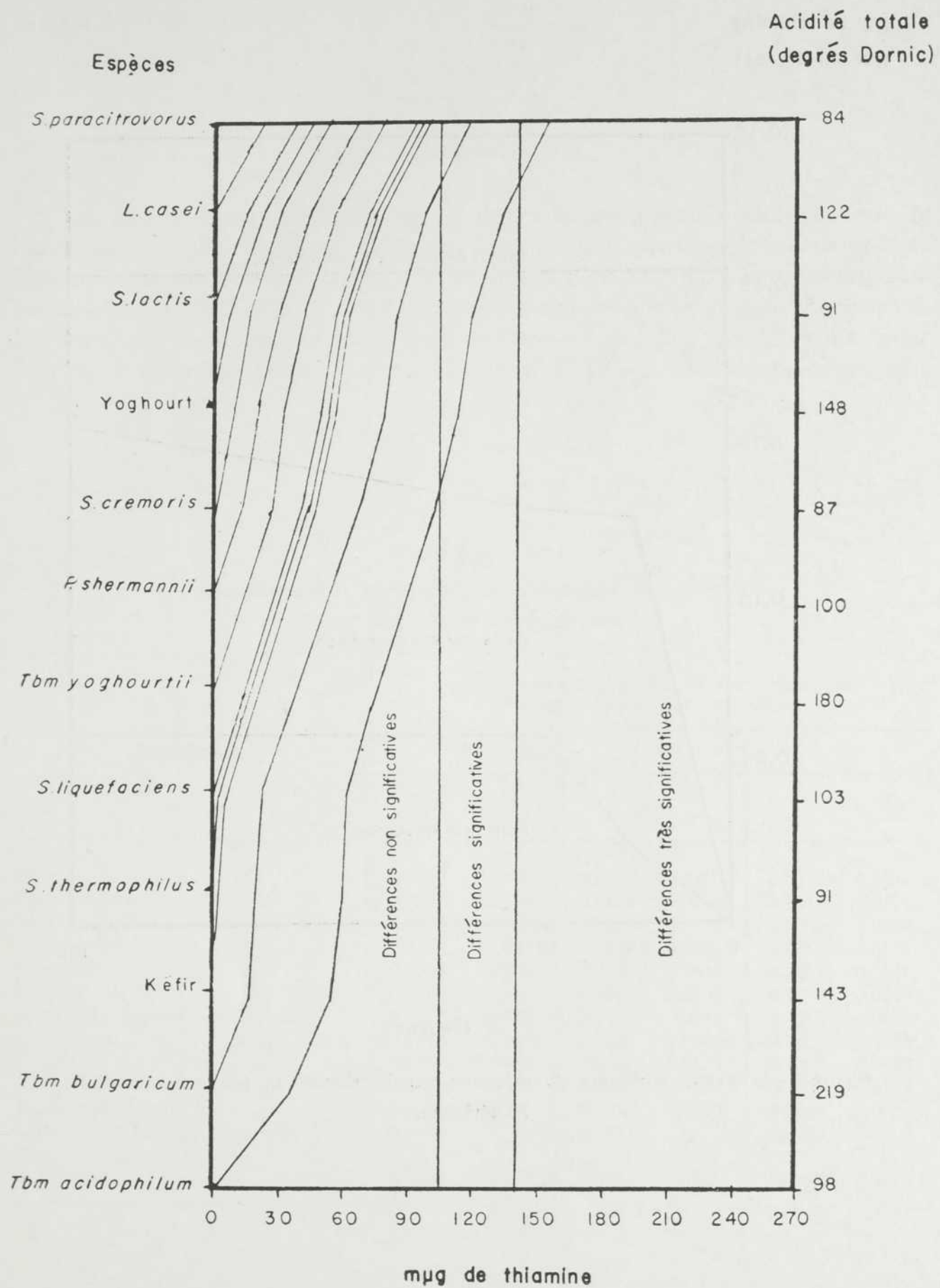


Figure I-3. Consommation de thiamine par ml de lait et acidité totale après 1 semaine d'incubation.

μg de thiamine
par ml de lait

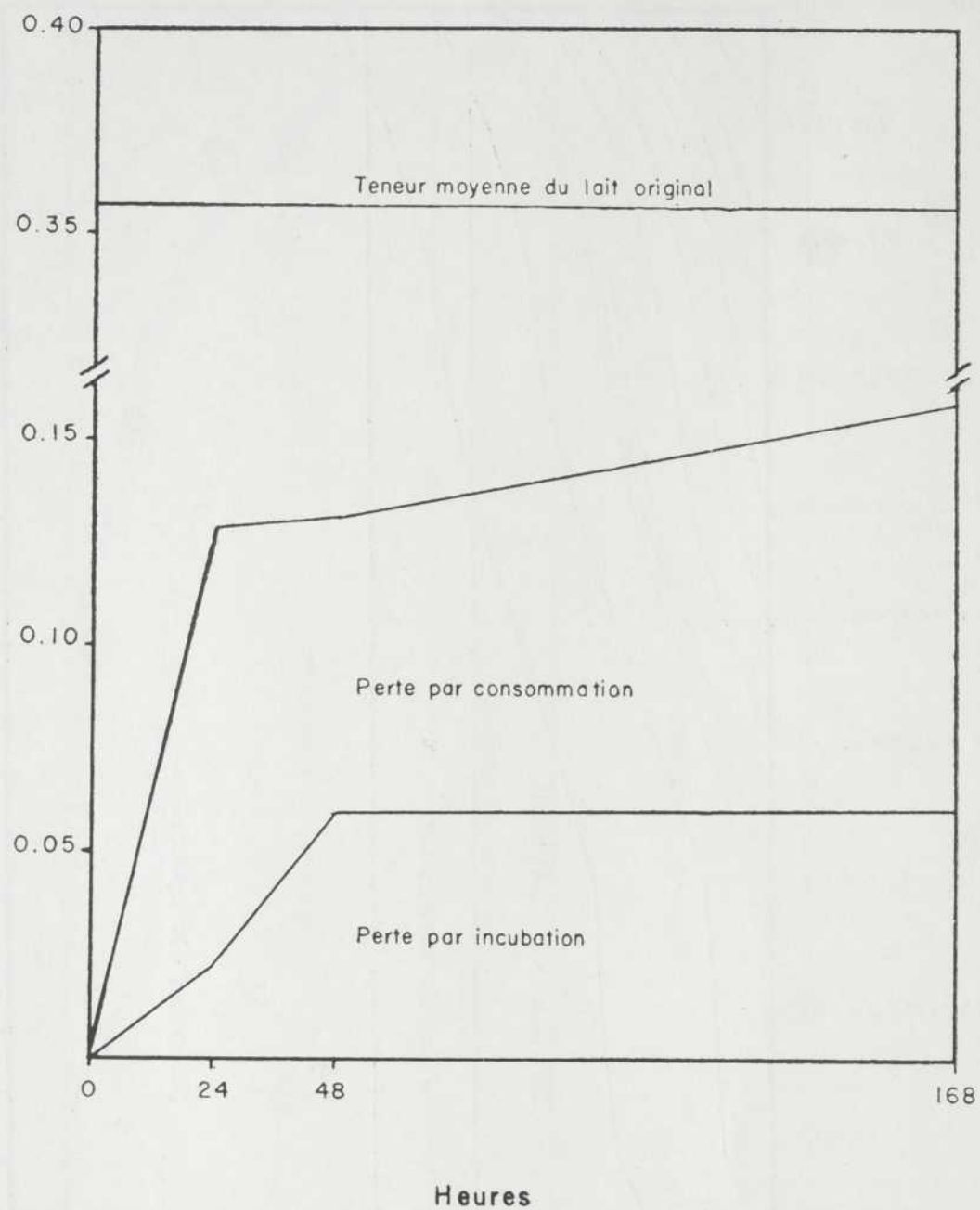


Figure I-4. Pertes moyennes de thiamine par incubation et par consommation bactérienne.

DISCUSSION

Les résultats exposés dans les 12 tableaux précédents indiquent que la multiplication des bactéries lactiques dans le lait amène généralement une diminution notable de la thiamine. La diminution attribuable à la consommation bactérienne est de $26.90\% \pm 15.04\%$ après une semaine (figure I-4). En général, les bactéries lactiques cultivées dans le lait exigent de la thiamine pour leur développement initial surtout (Tableau I-13). Il semble, toutefois, que

TABLEAU I-13
*Consommation moyenne de thiamine dans le lait
par les bactéries lactiques*

ESPÈCES (3 SOUCHES)	μg DE THIAMINE PAR ML DE LAIT APRÈS LES PÉRIODES D'INCUBATION SUIVANTES :					
	24 HRS		48 HRS		1 SEM.	
	— ×	+ —	— ×	+ —	— ×	+ —
<i>Tbm yoghourtii</i>	0.0499	0.0600	0.0543	0.0200	0.0813	0.0574
<i>Tbm bulgaricum</i>	0.0887	0.0316	0.0199	0.0264	0.0416	0.0316
<i>Tbm acidophilum</i>	0.0334	0.0238	0.0222	0.0200	0.0055	0.0164
<i>S. thermophilus</i>	0.0178	0.0683	0.0525	0.0387	0.0635	0.0173
Yoghourt.....	0.1566	0.0200	0.0758	0.0812	0.1161	0.0141
<i>L. casei</i>	0.0382	0.0245	0.0562	0.0300	0.1376	0.0748
<i>S. paracitrovorus</i>	0.2158	0.0632	0.1495	0.0346	0.1611	0.0400
<i>S. cremoris</i>	0.0818	0.0714	0.1525	0.0685	0.1074	0.0374
<i>S. lactis</i>	0.1819	0.0480	0.0577	0.0173	0.1242	0.0024
<i>S. liquefaciens</i>	0.0877	0.0346	0.0540	0.0283	0.0653	0.0173
<i>P. shermanii</i>	0.1611	0.0548	0.1055	0.0520	0.0944	0.0024
Kéfir (1 souche).....	0.0579		0.0831		0.0606	
—						
× générale	0.1064	0.0768	0.0704	0.0678	0.0962	0.0538

Thermobacterium yoghourtii, *Tbm bulgaricum* et *Streptococcus lactis* synthétisent de la thiamine d'une façon appréciable durant la deuxième journée d'incubation. Après une semaine, cependant, *Tbm yoghourtii* et *S. lactis* en ont consommée de nouveau (Tableau I-14).

TABLEAU I-14
Consommation ou synthèse de thiamine
dans le lait par les bactéries lactiques entre
les périodes d'incubation de 24, 48 hres et 1 sem.

ESPÈCES	Consommation (↘) ou synthèse (↗)					
	Entre 24 et 48 hres Valeur t, significative			Entre 48 hres et 1 sem. Valeur t, significative		
<i>Tbm yoghourtii</i>	2.89	↗	+	3.98	↘	+
<i>Tbm bulgaricum</i>	2.89	↗	+	0.92	↘	
<i>Tbm acidophilum</i>	0.63	↗		1.12	↗	
<i>S. thermophilus</i>	0.78	↘		0.45	↘	
Yoghourt.....	1.68	↗		0.85	↘	
<i>L. casei</i>	0.80	↘		1.74	↘	
<i>S. paracitrovorus</i>	1.61	↗		0.38	↘	
<i>S. cremoris</i>	1.23	↘		1.00	↗	
<i>S. lactis</i>	4.21	↗	+	6.58	↘	+
<i>S. liquefaciens</i>	1.31	↗		0.59	↘	
<i>P. shermanii</i>	1.28	↗		0.37	↗	
Kéfir.....		↘			↗	
—						
× générale	0.61	↗		0.52	↘	

La valeur t théorique est 2.74.

Bien que le nombre restreint de souches essayées limite nos considérations sur les différences de consommation vitaminique entre les espèces, nous croyons, d'après l'allure des figures I-1, I-2 et I-3, qu'à l'exception de l'association du yoghourt, les bactéries thermophiles cultivées dans le lait sont moins exigeantes en thiamine que les mésophiles. Forster (1931) a déjà fait des observations analogues au sujet du yoghourt.

Le développement d'acidité par les bactéries lactiques n'a aucune relation avec le taux de consommation de thiamine dans le lait, comme l'illustrent les Tableaux I-1 à I-12 et les figures I-1, I-2 et I-3.

Les expériences de Sure et Ford (1943) relatives à l'influence de l'incubation sur la stabilité de la thiamine dans le lait de vache indiquent une destruction de 6% à 22 C après une semaine, de 16% à 31 C et de 46% à 37 C après 22 heures. Nos résultats confirment les pertes observées par Sure et Ford. Nos témoins étaient soumis aux mêmes températures d'incubation que les laits cultivés, 41 C

pour les espèces thermophiles, 31 C ou 20 C pour les espèces mésophiles jusqu'à la coagulation du lait, puis 20 C jusqu'à la fin de l'expérience. Nous avons enregistré une perte moyenne par incubation de $17.48\% \pm 15.04\%$.

CONCLUSION

1. Les bactéries lactiques cultivées dans le lait consomment de la thiamine.
2. Cette consommation est évidente durant les premières heures d'incubation et correspond à la multiplication rapide des bactéries.
3. *Tbm yoghourtii*, *Tbm bulgaricum* et *S. lactis* semblent former des quantités appréciables de thiamine après 24 à 48 heures d'incubation, mais les gains se transforment généralement en pertes par la suite.
4. Il n'existe pas de relation entre l'acidité développée dans le lait par les bactéries lactiques et leurs exigences en thiamine.
5. La stabilité de la thiamine dans le lait est influencée par la température d'incubation.

BIBLIOGRAPHIE

- ABDEL-SALAAM, Ali, et LEONG, Peng Chong 1938 Synthesis of vitamin B₁ by intestinal bacteria of the rat. *Biochem. J.*, **32**, 958.
- ALEXANDER, B., et LANDIVEHR, G. 1945 The role of fecal thiamin and cocarboxylase in human nutrition. *Science*, **101**, 229.
- BECHDEL, S. I., HANNAH, E., HONEYWELL, E., DUTCHER, R. A., et KNUTSEN, M. H. 1928 Synthesis of vitamin B in the rumen of the cow. *J. Biol. Chem.*, **80**, 231.
- BONNER, J. 1937 The role of vitamins in plant development. *Botan. Rev.*, **3**, 616.
- BURKHOLDER, P. R., et McVEIGH, I. 1942 *Proc. Natl Acad. Sci.*, **28**, 285.
- COOPER, E. A. 1914 On the protective and curative properties of certain foodstuffs against polyneuritis indicated in birds by diet of polished rice. *J. Hyg.*, **14**, 12.
- COOPER, E. A., et FUNK, C. 1911 Experiments on the causation of Beri-Beri. *Lancet*, **2**, 1266.
- DAMON, S. R. 1921 Bacteria as a source of water soluble B vitamins. *J. Biol. Chem.*, **48**, 379.
- DAMON, S. R. 1923 Some observations in regard to growth promoting substances of bacterial origin. *J. Biol. Chem.*, **56**, 395.
- DORFMAN, K., KOSER, S. A., REAMES, H. R., SWINGLE, K. F., et SAUNDERS, F. 1939 *J. Infectious Diseases*, **65**, 163.
- DUSI, H. 1939 La pyrimidine et le thiazole, facteurs de croissance pour le flagellé à chlorophylle, *Euglena pisciformis*. *Compt. rend. soc. biol.*, **130**, 419.
- EIJKMAN, van H., et DERKS, M. 1922, *J. Biol. Chem.*, **50**, 311.
- EVANS, E. V., IRVINE, O. R., et BRYANT, L. R. 1946 *J. Nutrition*, **32**, 227.
- EVANS, W. C., HANDLEY, W. R. C., et HAPPOLD, F. C. 1939 *Brit. J. Exptl Pathol.*, **23**, 96.
- FORSTER, K. A. 1931 *Biochem. Z.*, **236**, 276.
- GENUNG, E. F., et LEE, M. E. 1944 Studies on the synthesis of thiamin by certain strains of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **47**, 434.
- GRIFFITH, W. H. 1935a Studies on growth. III. B and G avitaminosis in cecectomized rats. *J. Nutrition*, **10**, 667.

- GRIFFITH, W. H. 1935b The vitamin B and G content of the body tissues of normal and experimental rats. *J. Nutrition*, **10**, 675.
- GUERRANT, N. B., et DUTCHER, R. A. 1932 *J. Biol. Chem.*, **98**, 225.
- GUERRANT, N. B., et DUTCHER, R. A. 1934 *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **31**, 796.
- GUERRANT, N. B., DUTCHER, R. A., et BROWN, R. A. 1937 Further studies concerning the formation of B vitamins in the digestive tract of the rat. *J. Nutrition*, **13**, 305.
- GUERRANT, N. B., DUTCHER, R. A., et TOMEY, L. F. 1935 The effect of the type of carbohydrate on the synthesis of the B vitamins in the digestive tract of the rat. *J. Biol. Chem.*, **110**, 233.
- GUHA, B. C. 1932 The synthesis of vitamin B₁ and "bios" by *Bacillus vulgatus*. *Indian J. Med. Research*, **19**, 977.
- HAWKER, L. 1939 *Am. J. Botany*, **3**, 657.
- HENNESSY, D. J., et CERECEDO, L. R. 1939 *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 179.
- HODSON, A. Z. 1945 *Food Research*, **10**, 351.
- HUNT, H., KICK, C. H., BURROUGHS, W. E., BETHKE, R. M., SCHALK, A. F., et GERLAUGH, P. 1941 Studies on riboflavin and thiamin in the rumen content of cattle. *J. Nutrition*, **21**, 85.
- KAVANAGH, F. 1942 The interaction between thiamin and four fungi. *Bull. Torrey Botan. Club*, **69**, 669.
- KNIGHT, B. C. J. G. 1937 *Biochem. J. (London)*, **31**, 731.
- KNIGHT, B. C. J. G. 1937 *Biochem. J. (London)*, **31**, 966.
- KUROYA, M., et HOSOYA, S. 1923 *Science Rep. Govt Inst. Infect. Dis., Tokyo Imp. Univ.*, **2**, 287.
- LECOQ, R., et VILLETTE, R. 1935 *Compt. rend. soc. biol.*, **119**, 274.
- LEONG, P. C. 1937 *Biochem. J. (London)*, **31**, 373.
- LEONIAN, L. H., et LILLY, V. G. 1942 Vitamin synthesis by a yeast converted from a heterotrophic to an autotrophic habit. *Science*, **95**, 658.
- LWOFF, A. 1939 Recherches sur le pouvoir de synthèse des flagellés trypanosomidés. *Bull. inst. Pasteur*, **37**, 261.
- LWOFF, A., et DUSI, H. 1937a La pyrimidine et le thiazole, facteurs de croissance pour le flagellé *Polytomella caeca*. *Compt. rend.*, **205**, 630.
- LWOFF, A., et DUSI, H. 1937b Le thiazole pour les flagellés *Polytoma caudatum* et *Chilomonas paramecium*. *Compt. rend.*, **205**, 756.
- LWOFF, A., et DUSI, H. 1937c Le thiazole, facteur de croissance pour *Polytoma ocellatum* (chlamydomonadiné). Importance des constituants de l'aneurine pour les flagellés leucophytes. *Comp. rend.*, **205**, 882.
- LWOFF, A., et DUSI, H. 1938 Culture de divers flagellés leucophytes en milieu synthétique. *Compt. rend. soc. biol.*, **127**, 53.
- McELROY, L. W., et GOSS, H. 1941 A quantitative study of vitamins in the rumen contents of sheep and cows fed vitamin-low diets. *J. Nutrition*, **21**, 165.
- MOLLER, E. F. 1938 *Z. physiol. Chem.*, **254**, 285.
- MOLLER, E. F., ZIMO, O., JUNG, F., et MOLL, T. 1939 *Naturwissenschaften*, **27**, 228.
- NAJJAR, V. A., et HOLT, L. E., Jr. 1943 The biosynthesis of thiamin in man and its implication in human nutrition. *J. Am. Med. Assoc.*, **123**, 683.
- NAJJAR, V. A., et HOLT, L. E., Jr., 1944 The biosynthesis of thiamin in man. *Nutrition Rev.*, **2**, 109.
- ONDRATSHEK, K. 1941 *Arch. Mikrobiol.*, **12**, 46.

- REICHELT, E. 1935 Monatsschr. Kinderheilk., 63, 138.
- REICHELT, E. 1939 Monatsschr. Kinderheilk., 77, 327.
- ROBBINS, W. J. et KAVANAGH, F. 1938a Plant Physiol., 13, 611.
- ROBBINS, W. J. et KAVANAGH, F. 1938b Am. J. Botany, 25, 229.
- ROBBINS, W. J. et MA, R. 1943 The relation of certain fungi to thiamin. Bull. Torrey Bot. Club, 70, 190.
- ROBERTSON, R. C. 1924a J. Infectious Diseases, 34, 395.
- ROBERTSON, R. C. 1924b J. Infectious Diseases, 35, 31.
- ROSCOE, Margaret H. 1931 The effects of coprophagy in rats deprived of the vitamin B complex. Biochem. J. (London), 25, 2056.
- SALMON, W. D. 1925 Vitamin B in the excreta of rats on a diet low in this factor. J. Biol. Chem., 65, 457.
- SCHEUNERT, H., et SCHIEBLICH, M. 1923 Biochem. Z., 57, 139.
- SCHIEBLICH, M. 1933 Biochem. Z., 259, 19.
- SILVERMAN, M., et WERKMAN, C. H. 1939 Adaptation of the propionic acid bacteria to vitamin B₁ synthesis including a method of assay. J. Bacteriol., 38, 25.
- SUNDERLIN, C., et WERKMAN, C. H. 1928 J. Bacteriol., 16, 2.
- SURE, B., et FORD, Z. W. 1943 Proc. Soc. Exptl Biol. Med., 54, 83.
- TATUM, E. L., et BELL, T. T. 1946 *Neurospora* biosynthesis of thiamin. Am. J. Botany, 33, 15.
- TATUM, E. L., WOOD, H. C., et PETERSON, W. H. 1936 Growth factors for bacteria. V. Vitamin B₁, a growth stimulant for propionic acid bacteria. Biochem. J. (London), 30, 1898.
- THEILER, A., GREEN, H. H., et VILJOEN, P. R. 1915 A contribution to the study of deficiency diseases with special reference to the Lambietke problem in South Africa. S. African Direct. Vet. Research Rept., 3-4, 7.
- THOMPSON, R. C. 1942 Univ. Texas Publ., No. 4237, 87.
- WEGNER, M. I., BOOTH, A. M., ELVEHJEM, C. A., et HART, E. B. 1940 Rumen synthesis of vitamin B complex. Proc. Soc. Exptl Biol. Med., 45, 769.
- WEILL, E., ARLOING, F., et DUFOURT, A. 1922 Essai de traitement de la carence du pigeon par des cultures mortes ou vivantes de microbes intestinaux. Compt. rend. soc. biol., 87, 50.
- WEST, P. M., et WILSON, P. W. 1938a Synthesis of growth factors by *Rhizobium trifolii*. Nature, 142, 397.
- WEST, P. M., et WILSON, P. W. 1938b Biological determination of vitamin B₁ (thiamin) in *Rhizobium trifolii*. Science, 88, 334.
- WEST, P. M., et WILSON, P. W. 1939 Growth factor requirements of the root nodule bacteria. J. Bacteriol., 37, 161.
- WHIPPLE, Dorothy, et CHURCH, C. F. 1935 Relation of vitamin B (B₁) to fat metabolism. I. The role of fat in the refection phenomenon. Proc. Am. Soc. Biol. Chem., 8, 98.
- WINOGRADSKY, S. 1889 Ann. inst. Pasteur, 3, 49.
- WOLLMAN, E., et VAGLIANO, M. 1922 Compt. rend. soc. biol., 86, 832.
- WOOD, H. G., ANDERSON, A. A., et WERKMAN, C. H. 1938 Nutrition of the propionic acid bacteria. J. Bacteriol., 36, 201.
- WOOD, H. G., GEIGER, C., et WERKMAN, C. H. 1940 Iowa State College J. Sci., 14, 367.
- WOOLLEY, D. W., et WHITE, A. G. C. 1943 J. Exptl Med., 73, 489.



III

INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA TENEUR DU LAIT EN RIBOFLAVINE

THE HISTORY OF THE
 REFORMATION IN SWITZERLAND

III

INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA TENEUR DU LAIT EN RIBOFLAVINE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

RÔLE DES LEVURES

Les observations relatives au rôle des levures dans la biosynthèse de la riboflavine sont peu nombreuses. En général, elles indiquent que, dans des conditions favorables, les levures peuvent synthétiser la riboflavine.

Ainsi, Flavies (1939) constate qu'à mesure que le sucre disparaît au cours de la fermentation alcoolique du jus de raisin, la teneur en thiamine diminue jusqu'au quart de sa valeur initiale, alors que celle de la riboflavine est quadruplée ou quintuplée. On peut déduire que les organismes de la fermentation peuvent synthétiser la riboflavine.

Burkholder (1943) indique que la levure *Candida guilliermondia* peut former la riboflavine dans un milieu synthétique. Dans une seconde communication, le même auteur (1944) rapporte l'importance de certains facteurs dans la formation de cette vitamine. Ainsi, le glucose semble de beaucoup préférable au maltose, au xylose et au galactose. L'urée, à raison de 0.5 g par litre, favorise la synthèse, alors qu'une concentration de 2 à 4 g par litre l'empêche. L'extrait de levure favorise la croissance, mais empêche la production de cette vitamine.

Tanner *et al.* (1945) étudient l'influence de chacun des constituants du milieu sur la synthèse des vitamines. Ils constatent que l'omission des éléments rares (B, Mn, Zn, Cu, Mo, et Fe) du milieu favorise la synthèse de la riboflavine. Quand chacun des éléments mineurs est subséquentement ajouté, la seule absence du fer empêche la synthèse. Ces auteurs démontrent que la production de riboflavine par les espèces du genre *Candida* est à son maximum quand la concentration en fer atteint 1 μ g par 100 ml de milieu. Par ailleurs, *Clostridium*

acetobutylicum exige une concentration en fer 100 fois plus grande (1 μ g par ml). *Candida flareri* synthétise beaucoup plus de riboflavine que *Candida guilliermondia*. Tanner *et al.* (1945) précisent, de plus, que les composés rapportés par Burkholder (1943) comme inhibiteurs de la production de riboflavine peuvent être employés lorsque la concentration en fer est adéquate.

RÔLE DES MOISSURES

En général, les moisissures requièrent la thiamine, mais ne dépendent pas d'une source extérieure de riboflavine. Plusieurs, comme *Aspergillus niger*, sont capables de synthétiser toutes les vitamines nécessaires à leur développement normal à partir de sucre, de minéraux et d'une source azotée (Robbins et Kavanagh, 1942).

RÔLE DES BACTÉRIES

Les propriétés des bactéries sont variables. Leurs exigences nutritives peuvent changer avec les espèces, les générations, voire les individus. Aussi, est-il difficile de classer d'une façon définitive les espèces synthétisantes. De plus, l'effet d'une substance donnée dépend généralement des autres constituants du milieu. Ces variations dans les exigences nutritives ont été étudiées par plusieurs (Wood *et al.*, 1937, 1938, 1940 ; McIlwain, 1940).

Orla-Jensen *et al.* (1936a, 1936b), travaillant avec quelques bactéries lactiques, expriment l'opinion que toutes les bactéries acido-lactiques vraies exigent pour leur croissance la présence de riboflavine dans le milieu de culture. Mais, l'année suivante, Wood *et al.* (1937) constatent que *Lactobacillus pentoaceticus* croît bien en l'absence de riboflavine. Snell et Strong (1939) mettent en doute les affirmations d'Orla-Jensen *et al.* (1936a, 1936b) en rapportant le pouvoir de synthétiser la riboflavine dans un milieu synthétique photolysé à pH alcalin chez 7 espèces de bactéries lactiques (*Lactobacillus arabinosus*, *L. pentosus*, *L. brassicae*, *L. pentoaceticus*, *L. mannitopoeus*, *L. mesenteroides* et *Streptococcus lactis*). Le fait que *S. lactis* croît bien en l'absence de riboflavine leur paraît spécialement surprenant, puisque cet organisme est abondamment approvisionné en riboflavine dans son milieu naturel, le lait.

Selon Wood *et al.* (1937, 1938), certaines espèces du genre *Propionibacterium* peuvent aussi se passer de riboflavine, quand les acides aminés font partie du milieu. Sullivan *et al.* (1943) déterminent l'influence de la maturation sur la teneur en riboflavine de 12 types différents de fromage et en arrivent à la conclusion que la variation de cette teneur est plutôt faible. D'après Campbell et Hucker (1944), plusieurs bactéries acido-lactiques produisent de l'acide en porportion, jusqu'à une certaine limite de la quantité de riboflavine présente.

Doudoroff (1938) reconnaît que certaines espèces de *Photobacterium phosphorescens* peuvent synthétiser la riboflavine pour fins de croissance et de

phosphorescence. Certaines colonies sombres et ternes, correspondant à une perte de pouvoir synthétique, deviennent lumineuses et luxuriantes par suite de l'addition de riboflavine au milieu.

Wood *et al.* (1940) trouvent une relation entre la thiamine et la riboflavine comme facteurs de croissance chez *Lactobacillus manni* et *L. lyophilophilus*. Quand l'une des deux vitamines est présente, l'autre n'est pas essentielle ; mais quand les deux vitamines sont omises, la croissance est compromise. Mentionnons que, dans quelques cas, les chercheurs ont noté une adaptation de croissance en l'absence de ces deux vitamines (Wood *et al.*, 1938 ; Silverman et Werkman, 1939).

Tittsler et Whittier (1941) démontrent aussi qu'une très grande variété de bactéries peuvent synthétiser la riboflavine. La quantité de riboflavine synthétisée après six transferts dans un milieu purifié varie entre 0.02 et 0.36 μg par ml de culture bactérienne. Cette étude porte sur 60 espèces représentant les genres suivants : *Escherichia*, *Aerobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Chromobacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* et *Bacillus*.

Parmi les autres espèces bactériennes possédant le pouvoir de synthétiser la riboflavine, mentionnons *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus flavus* (Schopfer, 1931 ; O'Kae, 1941), *C. diphtheriae* (Evans *et al.*, 1939), quelques espèces de bactéries dysentériques (Dorfman *et al.*, 1939), *Escherichia coli*, *Bacterium aerogenes*, *Alcaligenes fecalis*, *Bacillus mesentericus*, *Bacillus vulgatus* (Burkholder et McVeigh, 1942), *Pseudomonas fluorescens*, *Clostridium butylicum* (Thompson, 1942), *Proteus vulgaris*, *Rhizobium trifolii* (West et Wilson, 1938, 1939), le bacille de la tuberculose (Street et Reeves, 1940).

Dans une étude sur l'influence des conditions aérobies et anaérobies de la décomposition sur la transformation de certains intermédiaires du complexe B, Starkey (1944) révèle que la riboflavine est synthétisée en quantités considérables durant les cinq premiers mois de la décomposition de la matière organique. Après cette période, la teneur en riboflavine diminue progressivement. Cette synthèse est plus grande et plus rapide sous les conditions aérobies.

Rappelons enfin (Peterson et Peterson, 1945), que certains microorganismes préfèrent synthétiser leur propre riboflavine, plutôt que de s'approvisionner dans le milieu. En effet, ces auteurs signalent qu'avec *Aerobacter aerogenes*, l'addition d'un μg de riboflavine par ml de milieu n'occasionne aucun accroissement dans la teneur en riboflavine des cellules et qu'elle est même plus élevée quand il n'y a pas d'addition.

BIOSYNTHESE INTESTINALE

Kennedy et Palmer (1928) notent la présence de riboflavine dans les fèces du rat. Roscoe (1931) émet la théorie que, chez les rats coprophages, les vitamines

B sont probablement synthétisées dans l'intestin. Guerrant et Dutcher (1934) et Griffith (1935a, 1935b) précisent que la synthèse de la riboflavine chez le rat a pour siège le colon.

Lamoureux et Schumacher (1940) rapportent la biosynthèse de la riboflavine chez les volailles. Ces auteurs estiment que la teneur en riboflavine des fèces de poules maintenues à la température de la chambre augmente d'environ 100% après 24 heures et d'environ 300% après une semaine. Toutefois, aucune synthèse importante ne semble se produire chez la volaille en raison du bref séjour de l'aliment dans l'intestin de l'oiseau et de l'influence inhibitrice de la température physiologique (107 F) sur la synthèse de la riboflavine dans les fèces. La cécectomie est sans effet appréciable sur le contenu en riboflavine des fèces. Les oiseaux peuvent donc s'approvisionner en riboflavine par coprophagie.

Olcese *et al.* (1948) affirment que le lapin synthétise la riboflavine.

Malgré ces observations, on reconnaît depuis quelques années l'importance de la riboflavine dans la nutrition des monogastriques. Plusieurs chercheurs ont observé un arrêt dans la croissance du rat et l'apparition de symptômes pathologiques sévères chez cet animal lorsqu'il reçoit une ration insuffisante en riboflavine (Edgar et MacRae, 1937 ; Day et Cosgrove, 1938 ; Bessey et Wolbach, 1939 ; El Sadr, 1940 ; Chick *et al.*, 1940).

Jukes (1937) démontre que la meilleure croissance du poussin nécessite 100 unités de riboflavine par 100 g d'aliments. Les recherches de Hodson (1940) indiquent que la riboflavine de la ration a un effet marqué sur sa teneur dans les organes du poussin, le foie et le coeur en particulier.

Des expériences chez d'autres espèces animales prouvent que la riboflavine est essentielle pour le porc (Hugues, 1939), le chien (Sebrell et Onstatt, 1938 ; Street et Cowgill, 1939 ; Margolis *et al.*, 1939 ; Potter *et al.*, 1942) et le renard (Schaefer *et al.*, 1947).

BIOSYNTHESE CHEZ LES RUMINANTS

Comme la thiamine, la riboflavine est synthétisée dans le rumen des polygastriques.

Jukes (1937) décèle chez le mouton 100 fois plus de riboflavine dans le rumen que dans les aliments ingérés. Cette observation est corroborée par McElroy et Goss (1939, 1940). Ces derniers servent à quatre moutons une ration d'une teneur en riboflavine évaluée à 0.3 μ g par gramme. À l'analyse, le contenu du rumen en possède 100 fois plus.

D'après Wegner *et al.* (1940), des génisses au rumen fistulé recevant une ration pauvre en cette vitamine forment des quantités significatives de riboflavine. Par contre, le veau soumis à une ration dépourvue de riboflavine présente des symptômes pathologiques (Wiese *et al.*, (1947).

Hunt *et al.* (1941) démontrent que la riboflavine est synthétisée dans le rumen du bouvillon, quand l'animal reçoit une ration composée de maïs jaune, de foin de luzerne et d'un supplément protéique. Lorsque le bouvillon ne reçoit que du foin de luzerne, il n'y a pas de biosynthèse de riboflavine dans le rumen. Kirch *et al.* (1938) considèrent que le foin alcalinise le milieu.

La synthèse de la riboflavine dans le rumen de la vache est bien exposée dans les revues de McElroy et Goss (1940) et Wegner *et al.* (1941).

Les vaches dont la ration est pauvre en riboflavine continuent à sécréter cette vitamine dans le lait (Kramer *et al.*, 1939 ; McElroy et Goss, 1940). Johnson *et al.* (1941) ont fait une constatation similaire chez la chèvre.

BIOSYNTHÈSE CHEZ L'HOMME

La biosynthèse de la riboflavine dans le tube digestif de l'homme est démontrée clairement par Najjar *et al.* (1944). L'assertion de ces chercheurs est basée sur l'ingestion durant 12 semaines d'une ration synthétique complétée de vitamines cristallines. L'excrétion totale de la riboflavine était de 5 à 10 fois la quantité ingérée. Najjar *et al.* (1944) reconnaissent que *B. coli communior* est l'organisme prédominant de la synthèse intestinale de ce facteur chez l'homme. Le fait que l'administration de sulfasuxidine ne supprime pas la synthèse de la riboflavine suppose que les organismes de la synthèse intestinale de cette vitamine sont en général sulfa-résistants et, en conséquence, différents des organismes de la synthèse intestinale de la thiamine. Cette biosynthèse chez l'homme est corroborée par Hathaway et Lobb (1946).

SOMMAIRE

Dans des conditions favorables, une très grande variété de microorganismes peuvent synthétiser la riboflavine.

Cette synthèse dans l'intestin est un fait établi. Les organismes qui en sont responsables semblent quelque peu différents des organismes de la synthèse intestinale de la thiamine, en raison de leur caractère sulfa-résistant. Chez les mono-gastriques, la synthèse intestinale, lorsqu'elle est observée, ne semble pas suffire à compenser toute insuffisance éventuelle. Les polygastriques sont toujours à l'abri de l'ariboflavine, grâce à la synthèse de la riboflavine dans le rumen.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE L'INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA TENEUR DU LAIT EN RIBOFLAVINE*

Nous avons rapporté antérieurement qu'une grande variété de microorganismes peuvent synthétiser la riboflavine. Il semble toutefois que les bactéries acido-lactiques sont particulièrement exigeantes en cette vitamine.

*Travail exécuté en 1948-1949.

Dans leurs expériences avec quelques bactéries lactiques, Orla-Jensen *et al.* (1936a, 1936b) en arrivent à la conclusion que toutes les bactéries acido-lactiques vraies exigent la riboflavine dans le milieu de culture. Campbell et Hucker (1944) rapportent, à leur tour, que plusieurs bactéries acido-lactiques produisent de l'acide en proportion de la quantité de riboflavine présente. Par contre, Wood *et al.* (1937) croient que *Lactobacillus pentoaceticus* peut se passer de riboflavine. Snell et Strong (1939) rapportent aussi que *L. arabinosus*, *L. pentosus*, *L. brassicae*, *L. pentoaceticus*, *L. mannitopoeus*, *L. mesenteroides* et *S. lactis* sont capables de synthétiser la riboflavine, lorsque ces bactéries sont cultivées dans un milieu synthétique photolysé à pH alcalin. D'après Wood *et al.* (1937, 1938), certaines espèces de *Propionibacterium* peuvent aussi se passer de riboflavine, à condition que le milieu contienne des acides aminés. Tittsler et Whittier (1941) mentionnent également que différentes espèces de bactéries acido-propioniques peuvent synthétiser la riboflavine.

Les études sur le comportement de la riboflavine dans les produits laitiers sont peu nombreuses. Forster (1931) signale que le Yoghourt est moins riche en vitamine B que le lait cru dont il provient. L'influence de la maturation sur la teneur en riboflavine a été étudiée par Sullivan *et al.* (1943) dans 12 types de fromage. D'après leurs résultats, la teneur en riboflavine varie peu durant la maturation du fromage. Irvine *et al.* (1945) parviennent à des conclusions identiques en ce qui regarde les fromages Cheddar, Brick et type Roquefort. Ces auteurs précisent que durant les deux premiers mois de la maturation du fromage Cheddar, à 40 et à 58 F, il y a une diminution apparente dans la teneur en riboflavine, mais ceci est compensé par un accroissement équivalent durant les derniers mois de la maturation.

Nous n'avons pas rencontré, dans la littérature, de rapports sur l'influence d'une bactérie lactique particulière sur la teneur en riboflavine d'un produit laitier. Ce manque de connaissances sur le comportement des bactéries lactiques cultivées en milieu naturel, ajouté au fait que le lait et certains de ses dérivés constituent la source la plus importante de riboflavine dans le régime alimentaire de l'homme, nous ont incités à étendre nos recherches à l'étude de l'action des bactéries lactiques sur la teneur du lait en riboflavine.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

La riboflavine fut mesurée directement en solution aqueuse par fluorométrie à l'aide du fluoromètre photoélectrique Coleman, modèle 12A, équipé des filtres B-2 et PC-2, et muni d'un stabilisateur de voltage. Nous avons employé, avec de légères modifications, la méthode de Hodson et Norris (1939) modifiée par Shetlar *et al.* (1945).

Cultures bactériennes. Des flacons ambrés spéciaux d'une capacité d'environ 125 ml et les pipettes nécessaires à l'inoculation furent stérilisées directement à

l'autoclave (30 min., 15 livres). Le lait destiné aux expériences fut écrémé, pasteurisé au bain-marie (10 min. à 95 C), refroidi à la température d'incubation, puis réparti par portions de 100 ml dans les flacons.

Des cultures pures, rajeunies par un ou deux repiquages, ont servi à l'inoculation. Les flacons de lait stérile furent inoculés à raison de 2% de culture. L'action bactérienne fut paralysée dans les témoins par l'addition de 0.5% de chloroforme. Les flacons de lait ainsi inoculés furent placés à l'étuve à 41 C dans le cas des bactéries thermophiles, à 31 C ou à 20 C pour les mésophiles. Les flacons de lait furent retirés de l'étuve avec leurs témoins à mesure que le lait coagulait dans les cultures non-chloroformées et conservés à la température de la chambre jusqu'à la fin de l'expérience.

Nos essais ont porté sur 3 souches de chacune des espèces suivantes : *Thermobacterium yoghourtii*, *Tbm bulgaricum*, *Tbm acidophilum*, *Streptococcus thermophilus*, *S. paracitrovorus*, *S. cremoris*, *S. lactis*, *S. liquefaciens*, *Lactobacillus casei* et *Propionibacterium shermanii*, 3 souches différentes de l'association des organismes du Yoghourt, soit : *Thermobacterium bulgaricum*, *Tbm yoghourtii*, et *Streptococcus thermophilus* et les 5 organismes de la symbiose du Kéfir, soit *Streptococcus kefir*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus caucasicus*, *Saccharomyces fragilis* et *Torula kefir*.

Réactifs. Solution d'acide sulfurique 0.1 N ; solution tampon d'acétate de sodium 2.5 M ; solution-mère de riboflavine dosant 100 mg de riboflavine pure par litre d'éthanol à 5%. Comme l'alcalinité et la température ont la propriété d'accentuer la photodestruction de la riboflavine (Williams et Cheldelin, 1942), le pH fut abaissé aux environs de 4.5 par l'addition d'acide acétique glacial, et la solution fut gardée dans une bouteille ambrée, à la noirceur et au froid.

Préparation de l'extrait aqueux. À 25 ml d'acide sulfurique 0.1 N, on a mélangé 1 ml d'acétate de sodium dans un flacon ambré et 5 ml de l'échantillon à analyser, puis on a filtré le tout à travers un papier filtre Whatman no 1 et recueilli le filtrat dans un récipient opaque à la lumière.

Acidité. Nous avons déterminé l'acidité totale par titrimétrie, au moyen d'une solution 0.1 N d'hydroxyde de sodium, en présence de phénolphthaléine à 1% comme indicateur. Des échantillons de 9 ml ont servi aux titrations. Les résultats sont exprimés en degrés Dornic d'acidité.

RÉSULTATS

Les résultats sont rapportés dans les Tableaux I-15 à I-26 et illustrés dans les figures I-5 à I-8.

TABLEAU I-15
Influence de *Thermobacterium yoghourtii*
sur la teneur du lait en riboflavine

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE RIBOFLAVINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSUM- MATION
1	0	20	20	1.3026	1.3026		
	24 hrs	22	129	1.2769	0.9706	0.0257	0.3063
	48 hrs	22	144	1.2517	0.9195	0.0509	0.3322
	1 sem.	25	206	1.2578	0.8685	0.0448	0.3893
1c	0	20	20	1.3026	1.3026		
	24 hrs	20	136	1.2898	0.9195	0.0128	0.3703
	48 hrs	20	160	1.2388	0.8945	0.0638	0.3443
	1 sem.	22	310	1.2578	0.8685	0.0448	0.3893
1d	0	20	20	1.3026	1.3026		
	24 hrs	21	142	1.2640	0.9324	0.0386	0.3316
	48 hrs	21	168	1.2517	0.8812	0.0509	0.3705
	1 sem.	23	242	1.2517	0.8302	0.0509	0.4215

TABLEAU I-16
Influence de *Thermobacterium bulgaricum*
sur la teneur du lait en riboflavine

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE RIBOFLAVINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSUM- MATION
2b	0	20	20	1.3026	1.3026		
	24 hrs	22	110	1.2640	0.9839	0.0386	0.2801
	48 hrs	22	150	1.2260	0.9068	0.0766	0.3192
	1 sem.	23	217	1.2578	0.9324	0.0448	0.3254
2c	0	20	20	1.3026	1.3026		
	24 hrs	22	133	1.2640	0.9452	0.0386	0.3188
	48 hrs	22	164	1.2260	0.8812	0.0766	0.3448
	1 sem.	22	220	1.2640	0.9195	0.0386	0.3445
2d	0	20	20	1.3026	1.3026		
	24 hrs	21	140	1.2640	0.8945	0.0386	0.3695
	48 hrs	21	180	1.2132	0.8557	0.0894	0.3575
	1 sem.	22	239	1.2260	0.8429	0.0766	0.3831

TABLEAU I-17

*Influence de Thermobacterium acidophilum
sur la teneur du lait en riboflavine*

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE RIBOFLAVINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSUM- MATION
7	0	20	20	1.3026	1.3026		
	24 hrs	21	50	1.3026	1.1111	0.0000	0.1915
	48 hrs	21	60	1.2517	0.9706	0.0509	0.2811
	1 sem.	21	95	1.3154	0.9452	-0.0128	0.3702
7c	0	20	20	1.3026	1.3026		
	24 hrs	22	53	1.2898	1.0727	0.0128	0.2171
	48 hrs	22	61	1.2517	0.9839	0.0509	0.2678
	1 sem.	22	101	1.2769	0.9324	0.0257	0.3445
7d	0	20	20	1.3026	1.3026		
	24 hrs	22	54	1.2769	1.0727	0.0257	0.2042
	48 hrs	22	65	1.2517	1.0089	0.0509	0.2428
	1 sem.	22	98	1.3090	0.9324	-0.0064	0.3766

TABLEAU I-18

*Influence de Streptococcus thermophilus
sur la teneur du lait en riboflavine*

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE RIBOFLAVINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSUM- MATION
4	0	20	20	1.3026	1.3026		
	24 hrs	20	57	1.2517	1.0219	0.0509	0.2298
	48 hrs	20	68	1.2517	1.0472	0.0509	0.2045
	1 sem.	20	87	1.2640	1.0472	0.0386	0.2168
4a	0	20	20	1.3026	1.3026		
	24 hrs	20	60	1.1877	1.1236	0.1149	0.0641
	48 hrs	20	65	1.2388	1.0855	0.0638	0.1533
	1 sem.	20	87	1.2640	1.0855	0.0386	0.1785
4b	0	20	20	1.3026	1.3026		
	24 hrs	20	59	1.2898	1.0599	0.0128	0.2299
	48 hrs	20	67	1.2388	1.0219	0.0638	0.2169
	1 sem.	20	85	1.2132	1.0345	0.0894	0.1787

TABLEAU I-19
Influence de Streptococcus paracitrovorus
sur la teneur du lait en riboflavine

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE RIBOFLAVINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSUM- MATION
5	0	18	18	1.3154	1.3154		
	24 hrs	19	65	1.2898	0.6777	0.0256	0.6121
	48 hrs	20	80	1.3026	0.7542	0.0128	0.6249
	1 sem.	20	90	1.3026	0.6777	0.0128	0.6249
5b	0	18	18	1.3154	1.3154		
	24 hrs	20	70	1.2769	0.6777	0.0385	0.5992
	48 hrs	20	92	1.3408	0.7670	-0.0254	0.5738
	1 sem.	20	96	1.3026	0.6905	0.0128	0.6121
5d	0	18	18	1.3154	1.3154		
	24 hrs	20	68	1.2769	0.6777	0.0385	0.5992
	48 hrs	20	90	1.3408	0.7670	-0.0254	0.5738
	1 sem.	20	90	1.3026	0.6905	0.0128	0.6121

TABLEAU I-20
Influence de Streptococcus cremoris
sur la teneur du lait en riboflavine

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE RIBOFLAVINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSUM- MATION
6b	0	18	18	1.3154	1.3154		
	24 hrs	20	70	1.3026	0.6905	0.0128	0.6121
	48 hrs	20	82	1.3154	0.7160	0.0000	0.5994
	1 sem.	20	89	1.2969	0.7160	0.0185	0.5809
6c	0	18	18	1.3154	1.3154		
	24 hrs	20	68	1.3026	0.6905	0.0128	0.6121
	48 hrs	20	86	1.3154	0.7797	0.0000	0.5357
	1 sem.	20	93	1.2898	0.8302	0.0256	0.4596
6d	0	18	18	1.3154	0.3154		
	24 hrs	20	42	1.3026	0.8302	0.0128	0.4724
	48 hrs	20	60	1.3154	0.6905	0.0000	0.6249
	1 sem.	20	82	1.3026	0.7033	0.0128	0.5993

TABLEAU I-21

*Influence de Streptococcus lactis
sur la teneur du lait en riboflavine*

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE RIBOFLAVINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSOM- MATION
10a	0	18	18	1.3154	1.3154		
	24 hrs	20	40	1.2260	1.0855	0.0894	0.1405
	48 hrs	23	80	1.2260	1.1495	0.0894	0.0765
	1 sem.	40	91	1.1236	1.0219	0.1918	0.1017
10b	0	18	18	1.3154	1.3154		
	24 hrs	20	45	1.2005	1.1236	0.1149	0.0769
	48 hrs	21	79	1.2640	1.1111	0.0514	0.1529
	1 sem.	21	97	1.1750	1.0727	0.1404	0.1023
10c	0	18	18	1.3154	1.3154		
	24 hrs	20	47	1.2388	1.0985	0.0766	0.1403
	48 hrs	22	80	1.2517	1.0345	0.0637	0.2172
	1 sem.	22	94	1.2005	1.0472	0.1149	0.1533

TABLEAU I-22

*Influence de Streptococcus liquefaciens
sur la teneur du lait en riboflavine*

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE RIBOFLAVINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSOM- MATION
16a	0	17	17	1.2769	1.2769		
	24 hrs	19	50	1.2132	0.8302	0.0637	0.3820
	48 hrs	19	80	1.1750	1.0472	0.1019	0.1278
	1 sem.	20	90	1.2388	1.0345	0.0381	0.2043
18	0	17	17	1.2769	1.2769		
	24 hrs	19	56	1.1359	0.9814	0.1410	0.1545
	48 hrs	19	81	1.1495	1.0472	0.1274	0.1023
	1 sem.	20	91	1.2132	1.0587	0.0637	0.1545
18a	0	17	17	1.2769	1.2769		
	24 hrs	19	60	1.1622	0.9579	0.1147	0.2043
	48 hrs	19	84	1.1495	1.0472	0.1274	0.1023
	1 sem.	20	97	1.2388	1.0587	0.0381	0.1801

TABLEAU I-23
Influence de Lactobacillus casei
sur la teneur du lait en riboflavine

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE RIBOFLAVINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSUM- MATION
8	0	17	17	1.2769	1.2769		
	24 hrs	19	79	1.2517	0.9839	0.0252	0.2678
	48 hrs	19	100	1.2769	0.9814	0.0000	0.2955
	1 sem.	19	150	1.2640	0.9579	0.0129	0.3061
8a	0	17	17	1.2769	1.2769		
	24 hrs	19	54	1.2260	1.0855	0.0509	0.1405
	48 hrs	19	71	1.2769	1.0472	0.0000	0.2297
	1 sem.	19	132	1.2640	1.0089	0.0129	0.2551
8b	0	17	17	1.2769	1.2769		
	24 hrs	19	60	1.2388	1.0587	0.0381	0.1801
	48 hrs	19	80	1.2640	1.0100	0.0129	0.2540
	1 sem.	19	138	1.2640	0.9814	0.0129	0.2836

TABLEAU I-24
Influence de Propionibacterium shermanii
sur la teneur du lait en riboflavine

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE RIBOFLAVINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSUM- MATION
9a	0	18	18	1.3154	1.3154		
	24 hrs	20	40	1.2769	0.9452	0.0385	0.3317
	48 hrs	20	75	1.2388	1.0985	0.0766	0.1403
	1 sem.	20	90	1.2517	1.0345	0.0637	0.2172
9b	0	18	18	1.3154	1.3154		
	24 hrs	20	40	1.2769	1.1622	0.0385	0.1147
	48 hrs	20	71	1.2640	1.1622	0.0514	0.1013
	1 sem.	20	113	1.2260	1.0345	0.0894	0.1915
9g	0	18	18	1.3154	1.3154		
	24 hrs	20	35	1.3026	1.0727	0.0128	0.2299
	48 hrs	20	66	1.3154	1.2388	0.0000	0.0766
	1 sem.	20	100	1.2388	0.9706	0.0766	0.2682

TABLEAU I-25

Influence des bactéries du yoghourt
sur la teneur du lait en riboflavine*

SOUCHES	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE RIBOFLAVINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSOM- MATION
B	0	20	20	1.3026	1.3026		
	24 hrs	20	107	1.3026	0.9579	0.0000	0.3447
	48 hrs	20	115	1.2769	0.9068	0.0257	0.3701
	1 sem.	20	140	1.2898	0.8945	0.0128	0.3953
Da	0	20	20	1.3026	1.3026		
	24 hrs	20	80	1.2898	0.9324	0.0128	0.3574
	48 hrs	20	97	1.2898	0.9324	0.0128	0.3574
	1 sem.	20	127	1.2640	0.8945	0.0386	0.3695
De	0	20	20	1.3026	1.3026		
	24 hrs	20	111	1.1622	1.0345	0.1404	0.1277
	48 hrs	20	121	1.2769	1.0219	0.0257	0.2550
	1 sem.	20	156	1.2517	0.9579	0.0509	0.2938

**Thermobacterium bulgaricum*, *Thermobacterium yoghourtii*, *Streptococcus thermophilus*.

TABLEAU I-26

Influence des microorganismes du kéfir
sur la teneur du lait en riboflavine*

SOUCHE	ÂGE	ACIDITÉ TOTALE EN DEGRÉS DORNIC		μg DE RIBOFLAVINE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE PAR	
						INCUBA- TION	CONSOM- MATION
1	0	17	17	1.2769	1.2769		
	24 hrs	17	74	1.2132	1.0855	0.0637	0.1277
	48 hrs	17	86	1.2517	1.1359	0.0252	0.1158
	1 sem.	17	165	1.2517	1.1111	0.0252	0.1406

**Streptococcus kefir*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus caucasicus*, *Saccharomyces fragilis*, *Torula kefir*.

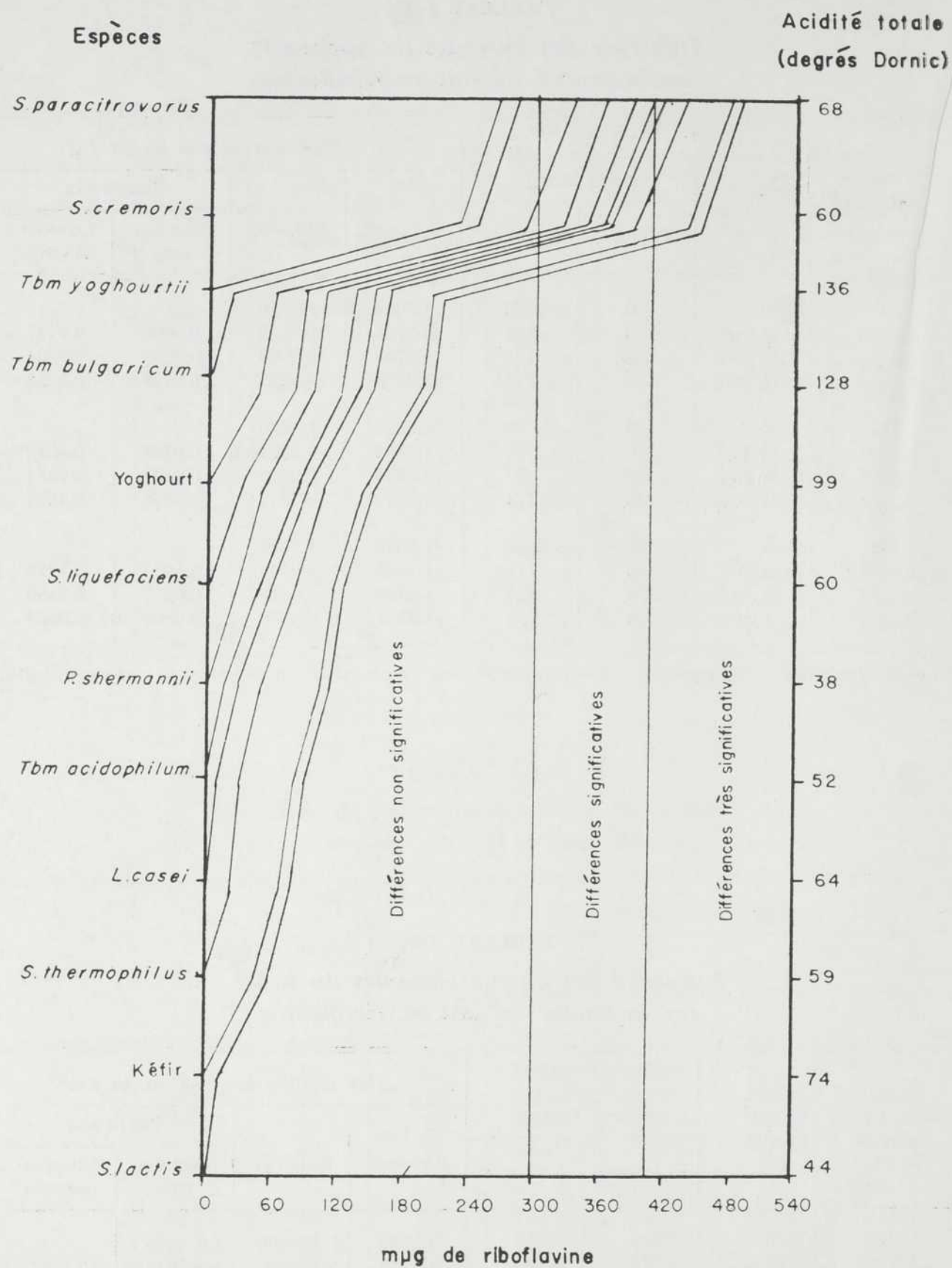


Figure I-5. Consommation de riboflavine par ml de lait et acidité totale après 24 heures d'incubation.

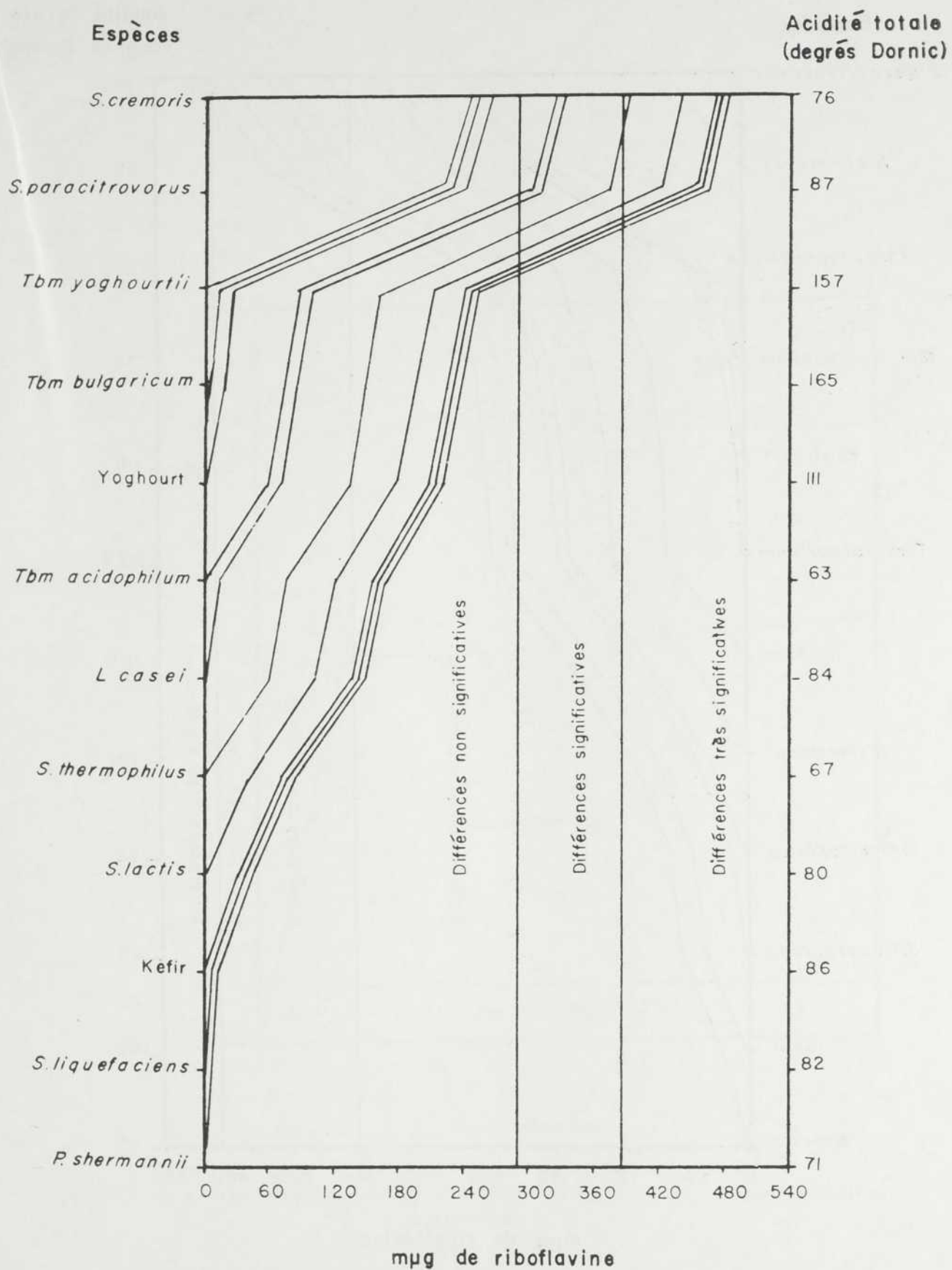


Figure I-6. Consommation de riboflavine par ml de lait et acidité totale après 48 heures d'incubation.

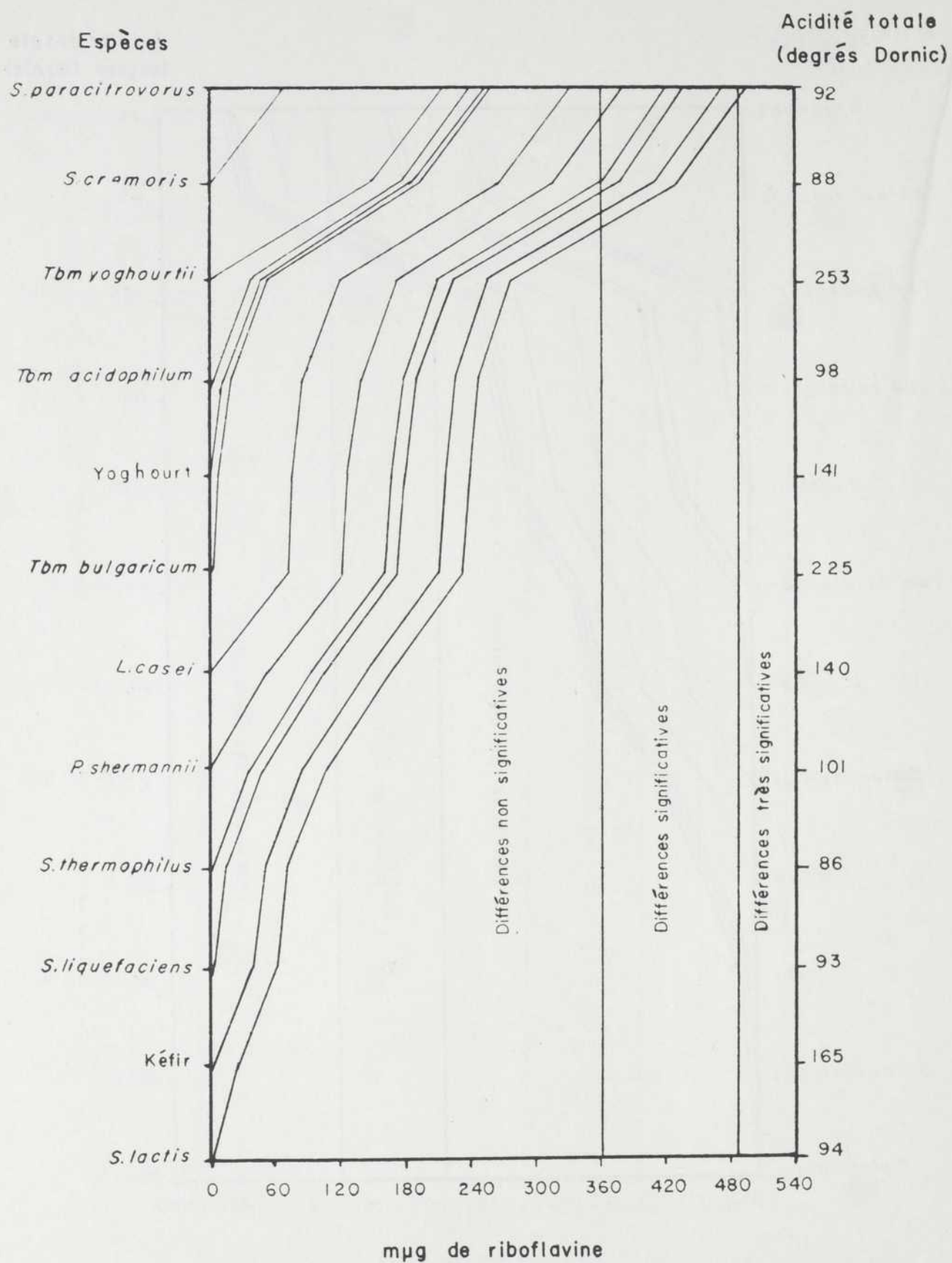


Figure I-7. Consommation de riboflavine par ml de lait et acidité totale après 1 semaine d'incubation.

μg de riboflavine
par ml de lait

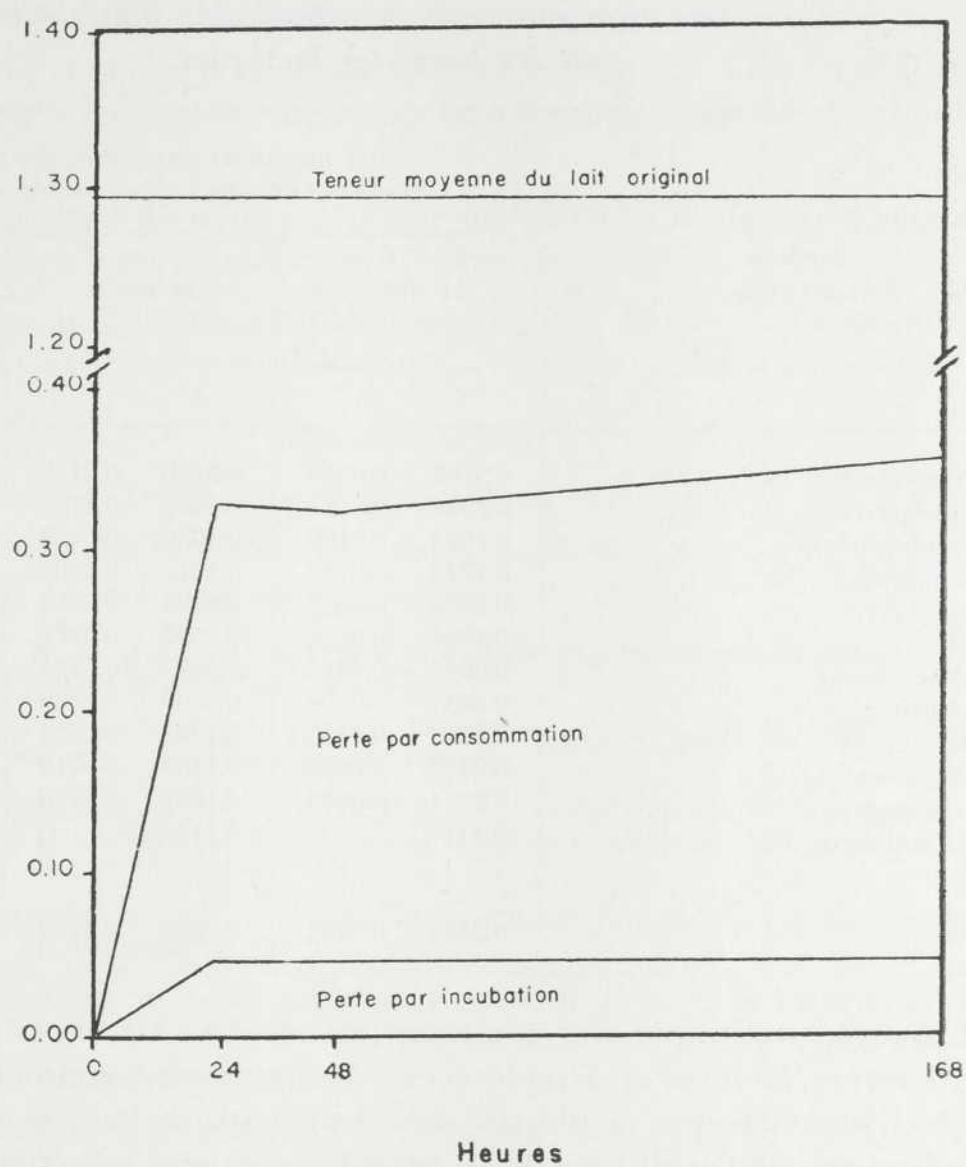


Figure I-8. Pertes moyennes de riboflavine par incubation et par consommation bactérienne.

DISCUSSION

L'étude des Tableaux I-15 à I-26 indique clairement que le développement des bactéries lactiques dans le lait est accompagné d'une diminution de la teneur en riboflavine. Toutefois, cette consommation ne nous apparaît sensible, dans tous les cas, que durant la première journée d'incubation (Tableau I-27), lors de la multiplication rapide des bactéries.

TABLEAU I-27
*Consommation moyenne de riboflavine dans le lait
par les bactéries lactiques*

ESPÈCES (3 SOUCHES)	µg DE RIBOFLAVINE PAR ML DE LAIT APRÈS LES PÉRIODES D'INCUBATION SUIVANTES :					
	24 HRS		48 HRS		1 SEM.	
	— ×	+ —	— ×	+ —	— ×	+ —
<i>Tbm yoghourtii</i>	0.3361	0.0259	0.3490	0.0158	0.4000	0.0158
<i>Tbm bulgaricum</i>	0.3228	0.0361	0.3405	0.0158	0.3510	0.0237
<i>Tbm acidophilum</i>	0.2043	0.0100	0.2639	0.0158	0.3638	0.0127
<i>S. thermophilus</i>	0.1746	0.0781	0.1916	0.0265	0.1913	0.0182
<i>Yoghourt</i>	0.2766	0.1053	0.3275	0.0501	0.3529	0.0135
<i>L. casei</i>	0.1961	0.0529	0.2597	0.0272	0.2813	0.0203
<i>S. paracitrovorus</i>	0.6035	0.0017	0.5653	0.0134	0.6164	0.0000
<i>S. cremoris</i>	0.5655	0.0794	0.5867	0.0369	0.5466	0.0620
<i>S. lactis</i>	0.1192	0.0300	0.1489	0.0574	0.1191	0.0241
<i>S. liquefaciens</i>	0.2473	0.0980	0.1108	0.0119	0.1796	0.0205
<i>Pbm shermanii</i>	0.2254	0.0883	0.1062	0.0126	0.2256	0.0319
Kéfir (1 souche).....	0.1277		0.1158		0.1406	
— × générale	0.2833	0.1493	0.2805	0.1760	0.3141	0.1617

L'analyse statistique des résultats (figures I-5, I-6 et I-7) fait voir que *Streptococcus cremoris* et *Streptococcus paracitrovorus* consomment beaucoup plus de riboflavine que la plupart des autres espèces bactériennes considérées. Les indications de l'acidité totale en regard des espèces bactériennes démontrent qu'il n'existe aucune relation entre l'acidité développée par les bactéries et leurs exigences exogènes en riboflavine. Par ailleurs, nous croyons qu'il serait intéressant de rechercher la relation possible entre la formation de substances aromatiques et les exigences en riboflavine des bactéries lactiques.

La perte moyenne de riboflavine sous l'influence de l'incubation du lait aux températures de 41 C pour les bactéries thermophiles, 31 C ou 20 C pour les bactéries mésophiles, fut en moyenne 3.4% ± 3.2% à la fin de l'expérience. Cette perte négligeable ne fut perceptible que durant la période initiale

d'incubation (figure I-8). Ces résultats corroborent ceux de Sure et Ford (1943) relatifs à la stabilité de la riboflavine durant l'incubation du lait de vache.

CONCLUSION

1. Le développement des bactéries lactiques dans le lait s'accompagne d'une diminution moyenne de $24.13\% \pm 12.42\%$ dans la teneur en riboflavine, après une semaine d'incubation.
2. Cette réduction n'est sensible que durant la période initiale, lors de la multiplication rapide des bactéries.
3. *Streptococcus cremoris* et *Streptococcus paracitrovorus*, cultivés dans le lait, montrent des exigences en riboflavine beaucoup plus grandes que la plupart des autres espèces considérées.
4. Le développement d'acidité totale par les bactéries lactiques ne semble pas en rapport avec leurs exigences en riboflavine.
5. L'incubation du lait aux températures de 41 C, 31 C et 20 C n'affecte pas sensiblement sa teneur en riboflavine.

BIBLIOGRAPHIE

- BESSEY, O. A., et WOLBACH, E. 1939 J. Expt Med., 69, 1.
- BURKHOLDER, P. R. 1943 Proc. Natl Acad. Sci. U. S., 29, 166.
- BURKHOLDER, P. R. 1944 Arch. Biochem., 4, 217.
- BURKHOLDER, P. R., et McVEIGH, I. 1942 Synthesis of vitamins by intestinal bacteria. Proc. Natl Acad. Sci. U. S., 28, 285.
- CAMPBELL, P. E., et HUCKER, G. J. 1944 Riboflavin requirements of certain lactic acid bacteria. Food Research, 9, 197-205.
- CHICK, Harriette, MacRAE, T. F., et WORDEN, A. N. 1940 Relation of skin lesions in the rat to deficiency in the diet of different B₂ vitamins. Biochem. J. (London), 34, 580.
- DAY, D., et COSGROVE, M. 1938 The arrest of nutritional cataract by the use of riboflavin. J. Nutrition, 15, 83.
- DORFMAN, E. G., KOSER, S. A., REAMES, H. R., SWINGLE, K. F., et SAUNDERS, F. 1939 J. Infectious Diseases, 65, 163.
- DOUDOROFF, M. 1938 Enzymologia, 5, 239.
- EDGAR, M., et MacRAE, T. F. 1937 Biochem. J., 31, 886.
- EL SADR, M. 1940 J. Pathol. Bacteriol., Proc., 50, 199.
- EVANS, W. C., HANDLEY, W. R. C., et HAPPOLD, F. C. 1939 Brit. J. Exptl Pathol., 23, 96.
- FLAVIES, H. 1939 Evolution des vitamines B₁ et B₂ au cours de la maturation du raisin et de la fermentation alcoolique. Compt. rend. soc. biol., 130, 499.
- FORSTER, K. A. 1931 Vitamin content of yoghurt. Biochem. Z., 236, 276.
- GRIFFITH, H. 1935a Studies on growth. III. B and G avitaminosis in cecectomized rats. J. Nutrition, 10, 667.
- GRIFFITH, H. 1935b Studies on growth. IV. The vitamin B and G content of the body tissues of normal and experimental rats. J. Nutrition, 10, 675.

- GUERRANT, N. B., et DUTCHER, R. A. 1934 Proc. Soc. Exptl Biol. Med., 31, 796.
- HATHAWAY, M. L., et LOBB, D. E. 1946 A comparison of riboflavin synthesis and excretion in human subjects on synthetic and natural diets. J. Nutrition, 32, 9.
- HODSON, A. Z. 1940 The influence of dietary riboflavin on the content of this vitamin in chicken tissues. J. Nutrition, 20, 377.
- HODSON, A. Z., et NORRIS, L. C. 1939 A fluorometric method for determining the riboflavin content of foodstuffs. J. Biol. Chem., 131, 621.
- HUGUES, M. 1939 The role of riboflavin and other factors of the vitamin B complex in the nutrition of the pig. J. Nutrition, 17, 527.
- HUNT, C. H., KICK, C. H., BURROUGHS, W. E., BETHKE, R. M., SCHALK, A. F., et GERLAUGH, P. 1941 Studies on riboflavin and thiamin in the rumen of cattle. J. Nutrition, 21, 85.
- IRVINE, O. R., BRYANT, L. R., SPROULE, W. H., JACKSON, S. H., CROOK, A., et JOHNSTONE, W. M. 1945 The retention of nutrients in cheese making. I. The retention of Ca, P, and B₂ in Cheddar cheese made from raw milk. Sci. Agr., 25, 817.
- IRVINE, O. R., BRYANT, L. R., SPROULE, W. H., JACKSON, S. H., CROOK, A., et JOHNSTONE, W. M. 1945 The retention of nutrients in cheese making. III. The Ca, P, and B₂ contents of cream, cottage, brick and blue cheeses. Sci. Agr., 25, 845.
- JOHNSON, P., MAYNARD, L. A., et LOOSLI, J. K. 1941 The riboflavin content of milk as influenced by diet. J. Dairy Sci., 24, 57.
- JUKES, T. H. 1937 Biological assay of lactoflavin with chicks. J. Nutrition, 14, 223.
- KENNEDY et PALMER 1928 J. Biol. Chem., 76, 607.
- KIRCH, G. H., GERLAUGH, P., SCHALK, A. F., et SILVER, E. A. 1938 Ohio Agr. Exptl Sta. Bull. No. 592.
- KRAMER, M. M., DICKMAN, R. M., HILDRETH, M. D., KUNERTH, B. L., et RIDDELL, W. H. 1939 The riboflavin value of milk. J. Dairy Sci., 22, 753.
- LAMOUREUX, W. F., et SCHUMACHER, A. E. 1940 Is riboflavin synthesized in the feces of fowl? Poultry Sci., 19, 418.
- MARGOLIS, L. H., MARGOLIS, M., et SMITH, M. 1939 Secondary deficiency of vitamin B₂ and riboflavin in the blacktongue reproducing diet. J. Nutrition, 17, 63.
- McELROY, L. W., et GOSS, H. 1939 Report on four members of the vitamin B complex synthesized in the rumen of the sheep. J. Biol. Chem., 130, 437.
- McELROY, L. W., et GOSS, H. 1940 A quantitative study of vitamins in the rumen contents of sheep and cows fed vitamin-low diets. I. Riboflavin and vitamin K. J. Nutrition, 20, 527.
- McILWAIN, H. 1940 Brit. J. Exptl Pathol., 21, 25.
- NAJJAR, V. A., JOHNS, G. A., MEDIARY, G. C., FLEISCHMAN, G., et HOLT, L. E. Jr. 1944 The biosynthesis of riboflavin in man. J. Am. Med. Assoc., 126, 357.
- O'KAE, D. J. 1941 The synthesis of riboflavin by staphylococci. J. Bacteriol., 41, 441.
- OLCESE, O., PEARSON, P. B., et SCEIGERT, B. S. 1948 The synthesis of certain B vitamins by the rabbit. J. Nutrition, 35, 577.
- ORLA-JENSEN, S., OTTER, N. C., et SNOG-KJAER, A. 1936a The vitamin and nitrogen requirements of the lactic acid bacteria. D. Kgl. Danske Videnskab. Selskab. Copenhagen, Ser., 9, 1.
- ORLA-JENSEN, S., OTTER, N. C., et SNOG-KJAER, A. 1936b Centr. Bakteriell. Parasitenk., 94, 434.
- PETERSON, W. H., et PETERSON, M. S. 1945 Relation of bacteria to vitamins and other growth factors. Bacteriol. Revs, 9, 49.

- POTTER, R. L., ALEXROD, A. E., et ELVEHJEM, C. A. 1942 The riboflavin requirement of the dog. *J. Nutrition*, **24**, 449.
- ROBBINS, W. J., et KAVANAGH, V. 1942 Vitamin deficiencies of the filamentous fungi. *Botan. Rev.*, **8**, 411.
- ROSCOE, Margaret H. 1931 The effects of coprophagy in rats deprived of the vitamin B complex. *Biochem. J. (London)*, **25**, 2056.
- SCHAEFER, A. E., WHITEHAIR, G. K., et ELVEHJEM, C. A. 1947 The importance of riboflavin pantothenic acid, niacin and pyridoxine in the nutrition of foxes. *J. Nutrition*, **34**, 131.
- SCHOPFER, W. H. 1931 *Compt. rend. soc. phys. et hist. nat. Genève*, **48**, 105.
- SEBRELL, W. H., et ONSTATT, H. 1938 *U. S. Public Health Repts*, **53**, 83.
- SHETLAR, M. R., SHETLAR, C. L., et LYMAN, J. F. 1945 Determination of riboflavin in chocolate milk and the comparative photochemical losses of riboflavin in chocolate and whole milk. *J. Dairy Sci.*, **28**, 873.
- SILVERMAN, M., et WERKMAN, C. H. 1939 Adaptation of the propionic acid bacteria to vitamin B₁ synthesis including a method of assay. *J. Bacteriol.*, **38**, 25.
- SNELL, E. E., et STRONG, F. M. 1939 The effect of riboflavin and of certain synthetic flavins on the growth of lactic acid bacteria. *Enzymologia*, **6**, 186.
- STARKEY, R. L. 1944 The transformation of certain vitamins of the B complex during decomposition under aerobic and anaerobic conditions. *J. Bacteriol.*, **47**, 312.
- STREET, H. R., et COWGILL, G. R. 1939 *Am. J. Physiol.*, **125**, 323.
- STREET, H. R., et REEVES, R. E. 1940 Occurrence of riboflavin in tubercle bacillus. *Proc. Soc. Expt Biol. Med.*, **44**, 641.
- SULLIVAN, R. A., BLOOM, E., et JARMOL, J. 1943 The value of dairy products in nutrition. III. The riboflavin, pantothenic acid, nicotinic acid and biotin content of several varieties of cheese. *J. Nutrition*, **25**, 463.
- SURE, B., et FORD, Z. W. 1943 Influence of incubation at 37 C on stability of thiamin and riboflavin in cow's milk. *Proc. Soc. Expt Biol. Med.*, **54**, 83.
- TANNER, F. W., Jr., VOJNOVICH, C., et VAN LANEN, J. M. Riboflavin production by *Candida* species, *Science*, **101**, 180.
- THOMPSON, R. C. 1942 Synthesis of B vitamins by bacteria in pure culture. *Univ. Texas Publ. No. 4237*, 87.
- TITSLER, R. P., et WHITTIER, E. C. 1941 The synthesis of riboflavin by bacteria and its role in symbiosis. *J. Bacteriol.*, **42**, 151.
- WEGNER, M. I., BOOTH, A. M., ELVEHJEM, C. A., et HART, E. B. 1940 Rumen synthesis of the vitamin B complex. *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **45**, 769.
- WEGNER, M. I., BOOTH, A. M., ELVEHJEM, C. A., et HART, E. B. 1941 Rumen synthesis of the vitamin B complex on natural rations. *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **47**, 90.
- WEST, P. M., et WILSON, P. W. 1938 Synthesis of growth factors by *Rhizobium trifolii*. *Nature*, **142**, 397.
- WEST, P. M., et WILSON, P. W. 1939 Growth factor requirement of the root nodule bacteria. *J. Bacteriol.*, **37**, 161.
- WIESE, A. C., JOHNSON, C. B., MITCHELL, H. H., et NEVENS, W. B. 1947 Riboflavin deficiency in the dairy calf. *J. Nutrition*, **33**, 263.
- WILLIAMS, R. R., et CHELDELIN, V. H. 1942 Destruction of riboflavin by light. *Science*, **96**, 22.
- WOOD, H. G., ANDERSON, A. A., et WERKMAN, C. H. 1937 *J. Bacteriol.*, **34**, 132.
- WOOD, H. G., ANDERSON, A. A., et WERKMAN, C. H. 1938 Nutrition of the propionic acid bacteria. *J. Bacteriol.*, **36**, 201.
- WOOD, H. G., GEIGER, C., et WERKMAN, C. H. 1940 *Iowa State College J. Sci.*, **14**, 367.

IV

INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA
TENEUR DU LAIT EN ACIDE NICOTINIQUE

THE NEW YORK PUBLIC LIBRARY
ASTOR LENOX TILDEN FOUNDATION
1215 6TH AVENUE NEW YORK 17, N. Y.

IV

INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA TENEUR DU LAIT EN ACIDE NICOTINIQUE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Comme préliminaire à l'étude expérimentale de l'influence des bactéries lactiques sur l'acide nicotinique du lait, voici d'abord un résumé des résultats de recherches relatives à la synthèse de l'acide nicotinique par les microorganismes et à la synthèse de cette vitamine dans l'organisme animal.

RÔLE DES LEVURES

D'une façon générale, les levures jouissent d'une grande puissance synthétisante. L'examen d'un grand nombre de variétés de *Saccharomyces cerevisiae* permet de constater leur aptitude à élaborer des coenzymes (Williams, 1941). D'après les travaux de Rogosa (1943 ; 1944), il semble que toutes les levures qui ne fermentent pas le lactose peuvent accomplir la synthèse de la niacine.

RÔLE DES MOISSURES

Robbins et Kavanagh (1942) affirment que plusieurs moisissures, *Aspergillus niger* particulièrement, synthétisent toutes les vitamines nécessaires à leur développement normal à partir d'un milieu sucré, minéralisé et azoté. Comme dans le cas de la riboflavine, la littérature ne rapporte aucune exigence en acide nicotinique chez les moisissures. Tatum et Beadle (1942a, 1942b), Tatum et Bonner (1943, 1944), Tatum *et al.* (1944) et Umbreit *et al.* (1946) ont étudié le contrôle génétique des réactions biochimiques et ont observé que certaines mutations de *Neurospora* possèdent des aptitudes à synthétiser le tryptophane, précurseur de l'acide nicotinique.

RÔLE DES BACTÉRIES

Les bactéries renferment des pouvoirs latents remarquables, mais plusieurs spécificités biologiques interviennent dans leurs exigences nutritives. On peut

entraîner des bactéries exigeantes à synthétiser certains facteurs de croissance. Koser et Wright (1943a, 1943b) ont obtenu, chez des bacilles de la dysenterie, des souches capables de croître dans un milieu pauvre en acide nicotinique. Le plus souvent, cette propriété acquise est le propre de quelques variétés à l'intérieur de l'espèce. C'est le cas de plusieurs bactéries acido-lactiques et acido-propioniques, de *Salmonella sp.* et *Escherichia coli* (Knight *et al.*, 1945). Diverses espèces bactériennes ne croissent qu'en présence de certains dérivés de la vitamine. Ainsi, les espèces du genre *Pasteurella* exigent l'amide de l'acide nicotinique (Koser *et al.*, 1941). Koser et Wright (1943a, 1943b) rapportent que la présence dans le milieu de certains facteurs du complexe B peut faciliter la synthèse bactérienne des autres facteurs.

L'acide nicotinique est indispensable aux bactéries lactiques ; c'est un fait qui semble établi (Snell *et al.*, 1938, 1939 ; Knight *et al.*, 1945 ; Krueger et Peterson, 1948 ; Niven, 1944 ; Peterson et Peterson, 1945 ; Snell, 1945). Toutefois Snell *et al.* (1938) ont observé le développement de certaines bactéries lactiques dans un milieu de caséine hydrolysée, dépourvu d'acide nicotinique, alors que Shankmann *et al.* (1947) ont maintes fois enregistré des résultats contraires. Kitay et Snell (1948) attribuent ces divergences à l'inoculum exceptionnellement volumineux utilisé par Shankmann *et al.* (1947) ; dans de telles conditions, certaines bactéries thésaurisent les vitamines et puisent dans leurs réserves lorsqu'on leur sert un aliment incomplet. Une étude sur la teneur vitaminique de plusieurs types de fromage (Sullivan *et al.*, 1943) reconnaît aux fromages Camembert et Roquefort une richesse remarquable en acide nicotinique. Ces auteurs suggèrent alors l'importance des nucléotides phosphopyridiques dans la scission normale de la molécule de caséine. Selon eux, la croissance des levures et des bactéries est responsable de l'accroissement défini qui s'établit dans la teneur en niacine du fromage Limburger.

Les bactéries du sol synthétisent probablement la niacine. En effet, durant les premiers jours de la décomposition de la matière organique, on assiste à une synthèse considérable d'acide nicotinique. Mais la synthèse est éphémère et après cinq mois, la vitamine disparaît graduellement (Starkey, 1944).

Les streptocoques hémolytiques sont exigeants en niacine (Rang et Subbarow, 1938), mais la plupart des variétés de *Streptococcus bovis* peuvent s'en priver, quoique la vitamine stimule légèrement leur croissance (Niven *et al.*, 1948).

Un grand nombre de bactéries détruisent ou utilisent l'acide nicotinique (Koser et Baird, 1944 ; Knight *et al.*, 1945). Quelques-unes le synthétisent : *Escherichia coli*, *Bacillus vulgatus*, *Aerobacter aerogenes*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus mesentericus* (Burkholder et McVeigh, 1942), *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus vulgaris*, *Clostridium butylicum* (Thompson, 1942) et plusieurs autres *Clostridium sp.* (Peterson et Peterson, 1945).

Kliger et Grossowicz (1941) font ressortir le rôle de l'acide nicotinique dans le métabolisme bactérien. L'absence de niacine annulerait le pouvoir glycolytique

anaérobie des bactéries et ralentirait l'oxydation aérobie, ce qui retarderait le catabolisme protéique. La présence dans le milieu d'un glucide fermentescible ou d'un acide organique utilisable conditionnerait donc l'efficacité de la vitamine. On croit, en effet, que l'intervention du glucose dans le métabolisme des acides aminés ressemble à celle du lactate et du pyruvate, d'après une étude sur la relation vitamines-activité métabolique des staphylocoques. D'après Kliger *et al.* (1943), certains organismes ne fermentent le glucose qu'en présence de niacine. On a fait cette observation chez *Bacillus proteus*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae* (Kliger *et al.*, 1940), *Salmonella paratyphi*, *Shigella dysenteriae* (Knight, 1937 ; Fildes, 1938 ; Kliger et Grossowicz, 1938, 1939, 1940, 1941).

BIOSYNTHESE INTESTINALE

Les constatations de la synthèse de l'acide nicotinique chez les animaux sont nombreuses. On a appris que cette synthèse s'effectuait normalement au niveau des tissus, mais on la rencontre aussi au niveau de l'intestin. Dans le premier cas, elle est d'origine animale ; dans le second, d'origine microbienne.

Les rations de composition glucidique (Ellinger *et al.*, 1947 ; Elvehjem, 1946) et l'abondance de la niacine dans les fèces de certaines espèces animales (Mitchell et Isbell, 1942) appuient l'hypothèse de la synthèse caecale.

Plusieurs insectes ne sont pas étrangers à la synthèse de l'acide nicotinique par les microorganismes. Les mouches *Galleria mellonella*, *Sitodrepa panicea* et *Silvanus surinamensis* sont du nombre (Rubinstein et Shekun, 1939 ; Fraenkel et Blewett, 1943a, 1943b).

BIOSYNTHESE CHEZ LES RUMINANTS

L'excrétion d'acide nicotinique dans l'urine des moutons se continue durant plusieurs mois en dépit d'une ration insuffisante en niacine. Cette observation suggère une synthèse de la vitamine quelque part dans le rumen ou les tissus (Pearson *et al.*, 1939, 1940 ; Winegar *et al.*, 1940 ; Bethke, 1946).

Une génisse au rumen fistulé peut synthétiser des quantités significatives d'acide nicotinique (Wegner *et al.*, 1940, 1941). Johnson *et al.* (1947) confirment ces observations, mais croient que la synthèse s'accomplit dans les tissus plutôt que dans le rumen ou l'intestin. Lundquist et Phillips (1943) prétendent que la niacine est encore essentielle dans l'alimentation du veau. Une synthèse analogue se constate d'ailleurs dans le rumen de la vache (Shourie et Swaminathan, 1940).

BIOSYNTHESE CHEZ L'HOMME

La pellagre humaine est une maladie par carence que l'ingestion de nicotinamide guérit (Ballif *et al.*, 1939). Mais la présence et la fréquence de la pellagre n'impliquent pas nécessairement l'impuissance de l'organisme humain à synthétiser l'acide nicotinique.

Ellinger et Coulson (1944) observent une différence quantitative considérable entre l'ingestion de nicotinamide et l'élimination de métachlorure de nicotinamide. Ellinger *et al.* (1944) notent aussi une diminution de l'excrétion urinaire de chlorure de N₁-méthyl nicotinamide chez les sujets recevant de la sulfaguanidine ou de la sulfasuxidine. Ellinger et Benesch (1945) nient l'intervention directe de la drogue sur le métabolisme de la nicotinamide ; le sulfathiazole, administré à des sujets témoins, n'influence presque pas l'excrétion urinaire de chlorure de N₁-méthyl nicotinamide ; le succinylsulfathiazole diminue l'excrétion de 60%. Ellinger *et al.* (1947) concluent donc à la biosynthèse intestinale de la niacine chez l'homme. Sont similaires les conclusions de Briggs *et al.* (1945), Najjar *et al.* (1946), Oldham *et al.* (1946), Perlzweig *et al.* (1947).

SOMMAIRE

L'acide nicotinique est une vitamine essentielle à la formation de plusieurs diastases utiles dans le métabolisme normal des substances alimentaires. Toutes les levures qui ne fermentent pas le lactose, la plupart des moisissures et un grand nombre de bactéries semblent le synthétiser.

Plusieurs bactéries intestinales élaborent cette vitamine tant chez les ruminants que chez les non-ruminants. La dextrine, le lactose et le lait favorisent l'établissement d'une flore qui synthétise la niacine (Krehl *et al.*, 1945a, 1945b).

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE L'INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA TENEUR DU LAIT EN ACIDE NICOTINIQUE*

Nous nous proposons, dans ce travail, d'évaluer quantitativement la synthèse ou l'utilisation de l'acide nicotinique par les bactéries lactiques cultivées dans le lait. À différentes périodes d'incubation, nous déterminons la teneur en acide nicotinique et le degré d'acidité totale, et nous tentons de saisir une corrélation entre ces deux valeurs.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cultures bactériennes

Nous avons utilisé trois souches de chacune des espèces suivantes : *Thermobacterium yoghourtii*, *Tbm bulgaricum*, *Tbm acidophilum*, *Streptococcus thermophilus*, *S. paracitrovorus*, *S. cremoris*, *S. lactis*, *S. liquefaciens*, *Lactobacillus casei* et *Propionibacterium shermanii*. Nous avons aussi utilisé deux souches de yoghourt et trois souches de kéfir. Ces associations comprennent respective-

*Travail exécuté en 1952.

ment les espèces suivantes : *Thermobacterium yoghourtii*, *Tbm bulgaricum* et *Streptococcus thermophilus* ainsi que *Lactobacillus caucasicus*, *L. casei*, *Streptococcus kefir*, *Saccharomyces fragilis* et *Torula kefir*.

Toutes ces souches sont entretenues en cultures pures par des repiquages fréquents dans du lait écrémé stérile enrichi de 0.2% de levure et de 3% de carbonate de calcium.

Pour chacune des douze espèces et associations, six flacons de 100 ml de lait écrémé chauffé à 100 C pendant 30 minutes et refroidi à la température optimum d'incubation sont inoculés en duplicata avec 2% de culture de chacune des trois souches. Les duplicatas reçoivent 0.5% de chloroforme et servent de témoins.

Des échantillons sont immédiatement prélevés pour les déterminations de l'acidité et de la teneur en acide nicotinique. Les six flacons demeurent à l'incubateur jusqu'à coagulation.

De nouveaux échantillons sont alors prélevés. Les six flacons sont par la suite conservés à la température de la chambre.

Les déterminations sont reprises après 24 heures pour les thermophiles, 48 heures pour les autres et après une semaine d'incubation pour toutes les souches.

Choix de la méthode

Les méthodes de détermination du facteur préventif de la pellagre se groupent en trois grandes classes. Les méthodes biologiques sont inutilisables, car le rat et le poulet ne manifestent pas de symptômes spécifiques sous des régimes carencés en acide nicotinique. Le chien, il est vrai, contracte, dans les mêmes conditions, un syndrome spécifique (la langue noire), mais se prête habituellement mal à ce genre de déterminations (Waisman *et al.*, 1940 ; Schaefer *et al.*, 1942 ; Robinson, 1951).

Les méthodes chimiques sont les plus rapides, mais manquent de précision et de spécificité. Deux réactions principales sont à la base de ces déterminations. La première est spécifique aux composés de la pyridine et utilise le 2, 4-dinitrochlorobenzène (Vongerickten, 1899) qui donne naissance à une couleur spécifique en présence de composés pyridiques. Quoique cette méthode ait rendu de grands services, on lui préfère aujourd'hui les méthodes basées sur la réaction de König (Robinson, 1951) : les dérivés pyridiques non substitués en α ou γ , en présence de CNBr et d'une amine aromatique, produisent une couleur dont on apprécie l'intensité au moyen du colorimètre photoélectrique (Williams *et al.*, 1950 ; Gyorgi, 1950). Ces méthodes comportent cependant de sérieux inconvénients : les modes d'extraction influencent grandement les résultats en transformant des substances inconnues en acide nicotinique (Kodicek, 1940 ; Cheldelin et Williams, 1942). De plus, la réaction colorimétrique est mal comprise (Bandier et Hald, 1939 ; Harris et Raymond, 1939 ; Melnick et Field, 1940 ; Dann et Handler, 1941 ; Martinek *et al.* 1943 ; Association of Vitamin Chemists, Inc.,

1951), et n'est pas spécifique à la niacine (Melnick *et al.*, 1940). Plusieurs autres méthodes chimiques ont connu la faveur des chercheurs (Robinson, 1951), mais comportent toutes des inconvénients plus ou moins sérieux dans la détermination de la vitamine dans les produits naturels.

Les méthodes microbiologiques sont beaucoup plus spécifiques (Gyorgi, 1950; Williams *et al.*, 1950; *Association of Vitamin Chemists, Inc.*, 1951); leur précision est 20 à 100 fois plus grande que les méthodes chimiques (Snell et Wright, 1941) et peut déceler 0.05 μg de niacine (Williams, 1942), quand l'organisme d'essai est *Lactobacillus arabinosus* 17-5. La méthode élaborée par Snell et Wright (1941) semble la plus répandue et utilise *Lactobacillus arabinosus* 17-5, qui « répond » à l'acide nicotinique, la nicotinamide, l'acide nicotinurique et la cozymase (DPN, TPN). Dans l'appréciation de la croissance, on préfère l'acidimétrie à la turbidimétrie.

Lactobacillus casei n'est pas aussi désirable que *Lactobacillus arabinosus* (Landy et Dicken, 1942) à cause de sa sensibilité aux lipides. Beaucoup d'autres organismes ont servi à la détermination de l'acide nicotinique: *Leuconostoc mesenteroides* (Johnson, 1945), *Proteus vulgaris* (Fildes, 1938; Lwoff et Querido, 1938), *Proteus HX 19* (Grossowicz et Shertinsky, 1947), *Shigella dysenteriae* (Dorfman *et al.*, 1940), *Shigella paradysenteriae* (Isbell *et al.*, 1941); *Torula cremoris* (Williams, 1946) est l'organisme d'essai d'une méthode très précise, mais sa sensibilité aux analogues et aux précurseurs de la vitamine diffère de celle de *Lactobacillus arabinosus* (Gyorgi, 1950).

Lactobacillus arabinosus 17-5 n'est stimulé dans sa croissance que par l'acide nicotinique, la nicotinamide, l'acide nicotinurique et la cozymase (Snell et Wright, 1941). La trigonelline (Snell et Wright, 1941) et la N-méthylnicotinamide (Krehl *et al.*, 1944) sont inactives. Pour connaître l'activité totale d'un produit naturel en acide nicotinique, on doit donc hydrolyser les formes combinées par des traitements acide, alcalin ou enzymatique. Cette extraction est cependant incertaine (Cheldelin et Williams, 1942) et, dans bien des cas, l'extraction aqueuse donne de très bons résultats (Snell et Wright, 1941). Dans le lait, il ne semble pas exister de formes conjuguées de la vitamine (Lawrence *et al.*, 1946), quoiqu'une méthode d'extraction à l'acide ait été généralement acceptée (*Association of Vitamin Chemists, Inc.*, 1951). Des essais préliminaires ne nous ont d'ailleurs révélé dans le lait aucune forme conjuguée qui ne soit active pour *Lactobacillus arabinosus* 17-5. Nous nous sommes donc contentés, dans ce travail, de pratiquer l'extraction aqueuse. Nous avons aussi suivi la méthode microbiologique de Snell et Wright (1941), modifiée et standardisée par *The Association of Vitamin Chemists, Inc.*, (1951).

Réactifs

Cette méthode repose sur le fait que l'acide nicotinique, la nicotinamide, l'acide nicotinurique ou la cozymase (Snell et Wright, 1941) sont essentiels à la croissance de *Lactobacillus arabinosus* 17-5 ATCC 8014. Le milieu d'essai doit

donc contenir toutes les substances essentielles pour cet organisme, excepté celles qui jouissent de l'activité de l'acide nicotinique. La croissance sera proportionnelle à la quantité de substances qui possèdent l'activité de l'acide nicotinique, quantité présente dans les solutions inconnues et dans la solution standard. On appréciera la croissance par acidimétrie.

Solution-mère d'acide nicotinique : 50 mg d'acide nicotinique dans 500 ml d'éthanol à 50%. Cette solution contient 100 μ g d'acide nicotinique par ml. On doit la conserver au réfrigérateur.

Solution standard d'acide nicotinique : 1 ml de la solution-mère complété à 1000 ml, avec de l'eau distillée. Cette solution contient 0.1 μ g d'acide nicotinique par ml. On la renouvelle chaque fois que l'on calibre la courbe standard.

Solution isotonique : 9 g de NaCl dissous dans une quantité suffisante d'eau distillée pour former un litre de solution. La solution est distribuée dans des tubes par portions de 10 ml. Les tubes sont bouchonnés au coton et stérilisés à 121 C pendant 20 minutes.

Solutions 10 N NaOH, N NaOH et 0.1 N NaOH.

Indicateur à 0.02% préparé par macération dans un mortier de 0.2 gm de bleu de bromethymol avec environ 600 ml d'éthanol. La couleur de l'indicateur est ajustée au vert-bleu avec 0.1 N NaOH. La solution est complétée à 1 litre avec de l'eau distillée.

Milieux de culture

Milieu solide de conservation :

Bacto-Tryptone.....	10 g
Glucose.....	1 g
K ₂ HPO ₄	2 g
CaCO ₃	3 g
Bacto-Yeast Extract (Difco Laboratories, Inc., Detroit, Mich.).....	10 g
Agar.....	15 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH.....	6.8

Le milieu est distribué en tubes par portions de 10 ml, stérilisé à 121 C pendant 15 minutes et refroidi en position verticale.

Milieu liquide d'inoculation :

Bacto-Yeast Extract.....	10 g
Glucose.....	1 g
K ₂ HPO ₄	1000 ml
Eau distillée.....	5 g
pH.....	6.8

Le milieu est distribué en tubes par portions de 10 ml et stérilisé à 121 C pendant 15 minutes.

Milieu d'essai :

"Vitamin-Free" Acid-Hydrolyzed Casein... (Nutritional Biochemicals, Inc., Cleveland, Ohio)	100 ml
L-cystine.....	400 mg
L-tryptophane.....	200 mg
L-asparagine hydratée.....	500 mg
Adénine.....	20 mg
Guanine.....	20 mg
Uracil.....	20 mg
Thiamine.....	800 µg
Pyridoxine.....	1 mg
Pantothénate de calcium.....	1 mg
Riboflavine.....	2 mg
Biotine.....	3 µg
Acide p-amino-benzoïque.....	500 µg
Glucose.....	40 g
Acétate de sodium.....	40 g
Sels minéraux :	
Solution A.....	10 ml
Solution B.....	10 ml

Ces quantités servent à la préparation de 1 litre de milieu. Cette concentration est double de celle qui existera dans les tubes avant l'inoculation par l'organisme d'essai. pH final : 6.8.

Plusieurs substances ne figurent qu'en quantités très faibles dans le milieu basal. Il devient donc nécessaire de préparer des solutions concentrées. Les solutions minérales ont la composition suivante :

Solution A -

K ₂ HPO ₄	25 g
KH ₂ PO ₄	25 g
Eau distillée.....	250 ml

Solution B -

MgSO ₄ 7 H ₂ O.....	10 g
NaCl.....	0.5 g
FeSO ₄ 7 H ₂ O.....	0.5 g
MnSO ₄ 4 H ₂ O.....	0.5 g
Eau distillée.....	250 ml

Les solutions sont renouvelées lorsqu'il devient impossible d'obtenir une suspension uniforme.

Cultures de Lactobacillus arabinosus 17-5 ATCC 8014

Culture de conservation. Chaque semaine, l'organisme d'essai est repiqué en profondeur dans 4 tubes de milieu solide, incubé pendant 24 heures à 37 C, puis conservé au réfrigérateur.

Inoculum. 24 heures avant l'inoculation, un tube de bouillon estensemencé à partir de la culture de conservation, incubé 24 heures à 37 C, puis centrifugé. Le liquide surnageant est décanté et le dépôt réparti dans 10 ml de solution isotonique, centrifugé de nouveau, débarrassé du liquide surnageant et porté de nouveau en suspension dans 10 ml de solution isotonique. Au moyen d'une seringue ou d'un compte-gouttes, tous les tubes sontensemencés avec une goutte de cette suspension.

Détermination de l'acide nicotinique

Préparation des tubes pour la courbe standard. Dans 20 tubes-à-essai, sont distribués en duplicata 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 et 5.0 ml de la solution standard contenant 0.1 μ g d'acide nicotinique par ml; le volume de chaque tube est complété à 5 ml avec de l'eau distillée.

Préparation des tubes de la solution inconnue. 2 échantillons de 9 et de 5 ml sont prélevés de chacun des six flacons de culture bactérienne. Le premier échantillon sert à la détermination de l'acidité, qui s'effectue par addition de 1 ml de bleu de brome-thymol 0.02% et de N/10 NaOH jusqu'à neutralisation à pH 6.8. L'acidité est exprimée en ml de N/10 NaOH. Le deuxième échantillon est alors neutralisé avec N NaOH et complété à 50 ml (dilution 1:10) avec de l'eau distillée. On possède alors pour chaque échantillon 6 dilutions qui sont distribuées en duplicata, dans des tubes-à-essai, à raison de 1.0, 2.0, 3.0 et 4.0 ml par tube. Le volume de chaque tube est enfin complété à 5 ml avec de l'eau distillée.

Tous les tubes, soit 68, reçoivent ensuite 5 ml de milieu d'essai et sont bouchonnés au coton, stérilisés tous à la fois à 121 C pendant 15 minutes et ensuite déposés à la température de la chambre pendant plusieurs heures, afin que la température soit uniforme dans tous les tubes lors de l'inoculation. Tous les tubes sont inoculés avec une goutte de culture et placés en même temps à l'incubateur à 37 C. Après 72 heures, ils sont refroidis au réfrigérateur pour arrêter la croissance.

Lecture. La croissance de *Lactobacillus arabinosus* s'apprécie par acidimétrie. Les tubes contenant la solution standard reçoivent 1 ml de l'indicateur et N/10 NaOH jusqu'à neutralisation au pH 6.8. On trace alors une courbe en portant en abscisses le nombre de μ g d'acide nicotinique par tube et en ordonnées le nombre de ml de N/10 NaOH. Ce dernier nombre est obtenu en faisant la moyenne arithmétique des duplicatas à chaque niveau.

Les tubes de la solution inconnue sont ensuite titrés et la moyenne des duplicatas est faite à chaque niveau. La teneur vitaminique est déterminée par interpolation sur la courbe standard. Les résultats de chaque niveau sont ramenés à 1 ml en multipliant par 1, 1/2, 1/3 et 1/4 respectivement. La moyenne arithmétique de ces quatre nombres est établie et les résultats qui

s'éloignent de plus de 10% de cette moyenne sont éliminés. On multiplie enfin par l'inverse de la dilution pour obtenir le nombre de μg d'acide nicotinique par ml de culture bactérienne.

RÉSULTATS

Nous rapportons, dans les Tableaux I-28 à I-39, la teneur en acide nicotinique de 35 cultures microbiennes à quatre périodes différentes d'incubation. Ces déterminations rendent compte de l'influence de chaque souche sur la teneur du lait en acide nicotinique après coagulation, laquelle correspond à peu près à la fin de la phase logarithmique de croissance, après 24 heures pour les thermophiles et 48 pour les mésophiles et après une semaine d'incubation. Les trois souches (2 souches dans le cas du yoghourt) nous permettent de calculer une moyenne dont nous avons tracé la résultante dans les figures I-9 à I-12; ces figures font voir le comportement des quatre groupes de bactéries lactiques: les thermophiles, les mésophiles A, les mésophiles B et le kéfir; leur température optimum de croissance se situe à 41 C, 37 C, 22 C et 22 C respectivement.

TABLEAU I-28

*Influence de Thermobacterium yoghourtii
sur la teneur du lait en acide nicotinique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		μg D'ACIDE NICOTINIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
I	0	1.5	1.5	0.43	0.43		
	3	3.3	7.2	0.43	0.36	0.00	-0.07
	24	4.7	15.0	0.41	0.34	-0.02	-0.07
	168	4.7	19.2	0.38	0.32	-0.05	-0.06
Ic	0	1.5	1.5	0.49	0.49		
	3	7.5	14.7	0.45	0.41	-0.04	-0.04
	24	7.5	22.2	0.35	0.29	-0.14	-0.06
	168	7.5	22.2	0.38	0.34	0.03	-0.04
Id	0	1.5	1.5	0.46	0.46		
	3	6.7	18.6	0.42	0.42	-0.04	0.00
	24	7.4	24.0	0.33	0.30	-0.13	-0.03
	168	7.4	26.6	0.37	0.33	-0.09	-0.04

TABLEAU I-29

*Influence de Thermobacterium bulgaricum
sur la teneur du lait en acide nicotinique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		µg D'ACIDE NICOTINIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
2a	0	1.6	1.6	1.12	1.12		
	3	1.6	8.3	0.57	0.41	-0.55	-0.16
	48	1.8	24.9	0.77	0.45	-0.35	-0.32
	168	1.8	29.9	0.63	0.51	-0.49	-0.12
2b	0	1.6	1.6	0.81	0.81		
	3	1.6	8.3	0.65	0.64	-0.16	-0.01
	48	1.8	25.5	0.63	0.58	-0.18	-0.05
	168	1.8	27.5	0.57	0.60	-0.24	0.03
2c	0	1.6	1.6	0.91	0.91		
	3	1.6	10.0	0.57	0.60	-0.44	0.03
	48	1.8	25.2	0.71	0.55	-0.20	-0.14
	168	1.8	26.1	0.76	0.65	-0.15	-0.11

TABLEAU I-30

*Influence de Streptococcus thermophilus
sur la teneur du lait en acide nicotinique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		µg D'ACIDE NICOTINIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
4	0	1.6	1.6	0.62	0.62		
	3	1.6	4.3	0.66	0.66	0.04	0.00
	48	1.7	6.6	0.66	0.61	0.04	-0.05
	168	1.7	7.0	0.66	0.66	0.04	0.00
4a	0	1.6	1.6	0.81	0.81		
	3	1.6	4.4	0.81	0.80	0.00	-0.01
	48	1.7	7.3	0.74	0.66	-0.07	-0.08
	168	1.8	7.6	0.75	0.66	-0.06	-0.09
4b	0	1.6	1.6	0.73	0.73		
	3	1.7	4.3	0.78	0.75	0.06	-0.03
	48	1.8	4.8	0.74	0.60	0.01	-0.14
	168	1.8	6.9	0.78	0.60	0.05	-0.18

TABLEAU I-31

*Influence de Thermobacterium acidophilum
sur la teneur du lait en acide nicotinique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		μg D'ACIDE NICOTINIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
7	0	1.6	1.6	1.01	1.01		
	5	1.7	4.7	1.00	0.95	-0.01	-0.05
	48	1.7	9.0	0.86	0.75	-0.15	-0.11
	168	2.1	12.7	0.71	0.67	-0.30	-0.04
7c	0	1.7	1.7	1.52	1.52		
	5	1.8	5.1	1.25	1.28	-0.27	0.03
	48	2.2	10.2	0.82	0.74	-0.70	-0.08
	168	2.3	11.6	0.74	0.62	-0.78	-0.12
7d	0	1.6	1.6	1.40	1.40		
	5	1.7	5.0	0.99	0.97	-0.41	-0.02
	48	2.0	8.9	0.65	0.62	-0.75	-0.03
	168	2.1	12.8	0.77	0.68	-0.63	-0.09

TABLEAU I-32

Influence des Bactéries du Yoghourt
sur la teneur du lait en acide nicotinique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		μg D'ACIDE NICOTINIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
3	0	1.5	1.5	0.63	0.63		
	3	1.5	8.0	0.66	0.62	0.03	-0.04
	48	1.5	15.1	0.70	0.56	0.07	-0.14
	168	1.5	15.1	0.66	0.63	0.03	-0.03
Da	0	1.5	1.5	0.73	0.73		
	3	1.5	7.4	0.73	0.67	0.00	-0.06
	48	1.5	16.7	0.73	0.52	0.00	-0.21
	168	1.5	18.2	0.53	0.39	-0.20	-0.14

**Thermobacterium yoghourtii*, *Thermobacterium bulgaricum*, *Streptococcus thermophilus*.

TABLEAU I-33

*Influence de Streptococcus paracitrovorus
sur la teneur du lait en acide nicotinique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		μg D'ACIDE NICOTINIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
5a	0	1.6	1.6	0.60	0.60		
	24	2.2	7.0	0.65	0.58	0.05	-0.07
	48	3.3	8.9	0.53	0.48	-0.07	-0.05
	168	3.4	8.9	0.60	0.48	0.00	-0.12
5b	0	1.6	1.6	0.61	0.61		
	24	1.8	7.7	0.60	0.57	-0.01	-0.03
	48	1.8	7.9	0.59	0.59	-0.02	0.00
	168	1.9	7.9	0.63	0.58	0.02	-0.05
5d	0	1.6	1.6	0.59	0.59		
	24	1.9	7.3	0.58	0.43	-0.01	-0.15
	48	1.9	7.6	0.49	0.50	-0.10	0.31
	168	1.9	7.7	0.63	0.58	0.04	-0.05

TABLEAU I-34

*Influence de Streptococcus cremoris
sur la teneur du lait en acide nicotinique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		μg D'ACIDE NICOTINIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
6b	0	1.6	1.6	0.76	0.76		
	24	1.7	5.0	0.69	0.61	-0.09	-0.08
	48	1.7	5.1	0.76	0.67	-0.02	-0.09
	168	2.0	7.5	0.83	0.96	0.05	-0.13
6c	0	1.6	1.6	0.76	0.76		
	24	1.7	7.0	0.81	0.66	-0.05	-0.15
	48	1.9	7.7	0.81	0.78	0.05	-0.03
	168	2.1	8.1	0.75	0.79	-0.01	0.04
6d	0	1.7	1.7	0.68	0.68		
	24	1.8	7.0	0.64	0.65	-0.04	0.01
	48	1.9	7.7	0.65	0.65	-0.03	0.00
	168	2.1	8.1	0.68	0.65	0.00	-0.03

TABLEAU I-35
Influence de *Propionibacterium shermanii*
sur la teneur du lait en acide nicotinique

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		μg D'ACIDE NICOTINIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
9a	0	1.6	1.6	0.77	0.77		
	24	1.7	4.7	0.81	0.70	0.04	-0.11
	48	2.0	5.0	0.66	0.42	-0.11	-0.24
	168	2.3	13.4	0.82	0.76	0.05	-0.06
9b	0	2.0	2.0	0.78	0.78		
	24	2.0	3.3	0.74	0.77	-0.04	0.03
	48	2.0	4.9	0.67	0.52	-0.11	-0.15
	168	2.4	13.0	0.70	0.66	-0.08	-0.04
9g	0	1.7	1.7	0.83	0.83		
	24	1.8	3.9	0.83	0.66	0.00	-0.17
	48	1.8	5.0	0.66	0.35	-0.17	-0.31
	168	2.3	13.1	0.85	0.63	0.02	-0.22

TABLEAU I-36
Influence de *Streptococcus lactis*
sur la teneur du lait en acide nicotinique

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		μg D'ACIDE NICOTINIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
10a	0	1.8	1.8	0.68	0.68		
	24	1.9	7.7	0.69	0.67	0.01	-0.02
	48	2.0	8.6	0.65	0.65	-0.03	0.00
	168	2.0	9.4	0.78	0.70	0.10	-0.08
10b	0	1.7	1.7	0.74	0.74		
	24	1.8	7.7	0.83	0.76	0.09	-0.07
	48	1.9	8.4	0.82	0.67	0.08	-0.15
	168	2.1	9.0	0.83	0.74	0.09	-0.09
10c	0	1.8	1.8	0.84	0.84		
	24	1.9	7.8	0.85	0.77	0.01	-0.08
	48	1.9	8.3	0.80	0.73	-0.04	-0.07
	168	2.0	9.1	0.74	0.65	-0.10	-0.09

TABLEAU I-37
Influence de Streptococcus liquefaciens
sur la teneur du lait en acide nicotinique

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		μg D'ACIDE NICOTINIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
16a	0	2.1	2.1	0.97	0.97		
	24	2.1	5.2	0.94	0.72	-0.03	-0.22
	48	2.2	8.0	1.31	1.14	0.34	-0.17
	168	2.4	8.6	1.11	1.05	0.14	-0.06
18	0	2.1	2.1	1.00	1.00		
	24	2.1	5.4	0.84	0.66	-0.16	-0.18
	48	2.0	7.9	1.08	1.31	-0.08	0.23
	168	3.2	8.1	1.17	1.25	0.17	0.08
18a	0	2.0	2.0	1.08	1.08		
	24	2.0	5.2	0.97	0.68	-0.11	-0.29
	48	2.2	7.9	1.11	1.08	0.03	-0.03
	168	2.2	8.6	1.12	0.97	0.04	-0.15

TABLEAU I-38
Influence de Lactobacillus casei
sur la teneur du lait en acide nicotinique

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		μg D'ACIDE NICOTINIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
8	0	1.6	1.6	0.95	0.95		
	24	1.6	6.5	0.76	0.62	-0.19	-0.14
	48	1.6	6.8	0.87	0.78	-0.08	-0.09
	168	1.8	11.5	0.73	0.74	-0.22	0.01
8a	0	1.5	1.5	0.90	0.90		
	24	1.5	6.8	0.86	0.80	-0.04	-0.06
	48	1.7	6.9	0.89	0.72	-0.01	-0.17
	168	1.8	11.2	0.70	0.62	-0.20	-0.08
8b	0	1.5	1.5	0.83	0.83		
	24	1.5	7.2	0.84	0.86	0.01	0.02
	48	1.6	7.5	0.81	0.69	-0.02	-0.12
	168	1.8	12.4	0.67	0.65	-0.16	-0.02

TABLEAU I-39
Influence des microorganismes du kéfir*
sur la teneur du lait en acide nicotinique

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		µg D'ACIDE NICOTINIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
O	0	1.6	1.6	0.95	0.95		
	24	1.6	7.0	0.96	0.56	0.01	-0.40
	48	1.6	8.6	0.77	0.29	-0.18	-0.48
	168	1.6	15.7	0.73	0.73	-0.22	0.00
A	0	1.6	1.6	0.95	0.95		
	24	1.6	6.9	0.96	0.66	0.01	-0.30
	48	1.6	8.8	0.77	0.73	-0.18	-0.04
	168	1.6	15.8	0.73	1.42	-0.22	0.69
NB	0	1.6	1.6	0.95	0.95		
	24	1.6	7.1	0.96	0.79	0.01	-0.17
	48	1.6	8.4	0.77	0.84	-0.18	0.07
	168	1.6	14.3	0.73	1.02	-0.22	0.29

**Lactobacillus caucasicus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus kefir*, *Saccharomyces fragilis*, et *Torula kefir*.

Des essais préliminaires nous révélèrent que l'activité vitaminique totale du lait s'établissait à environ 0.6 µg par ml. Durant nos expériences, effectuées à différentes périodes de l'année, cette teneur a varié de 0.46 à 1.30 µg. La moyenne de 35 déterminations s'établit à 0.83 µg. Ces résultats correspondent bien à ceux que l'on rencontre dans la littérature.

Nous ne distinguons pas, dans ce travail, l'importance des différentes substances qui confèrent au lait son activité vitaminique. *Lactobacillus arabinosus* répond indifféremment à l'acide nicotinique et à la nicotinamide, les deux seuls facteurs préventifs de la pellagre que l'on rencontrerait dans le lait.

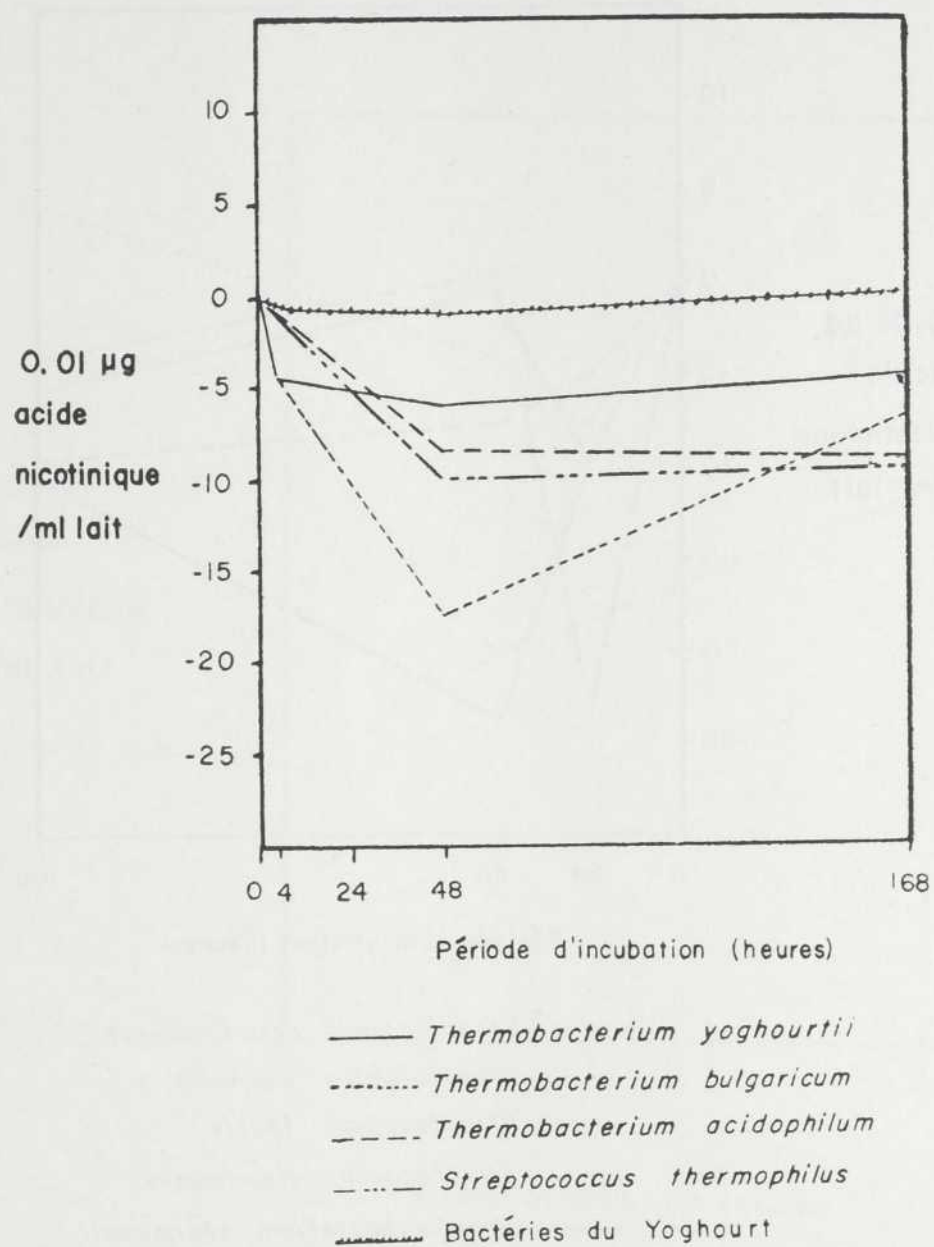


Figure I-9. Augmentation ou diminution de la teneur originale du lait (O) en acide nicotinique. Influence des bactéries lactiques thermophiles.

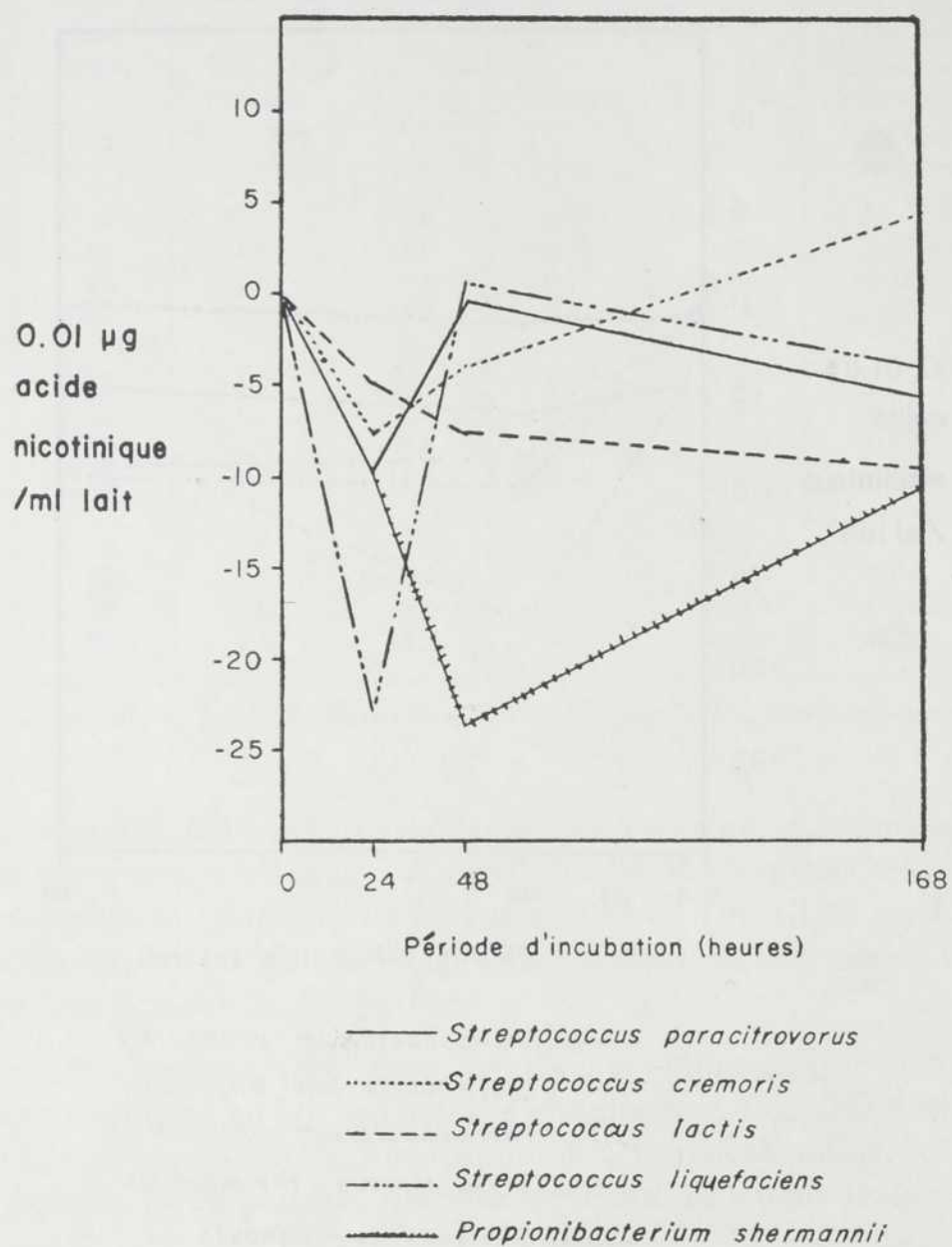


Figure I-10. Augmentation ou diminution de la teneur originale du lait (O) en acide nicotinique. Influence des bactéries lactiques mésophiles A.

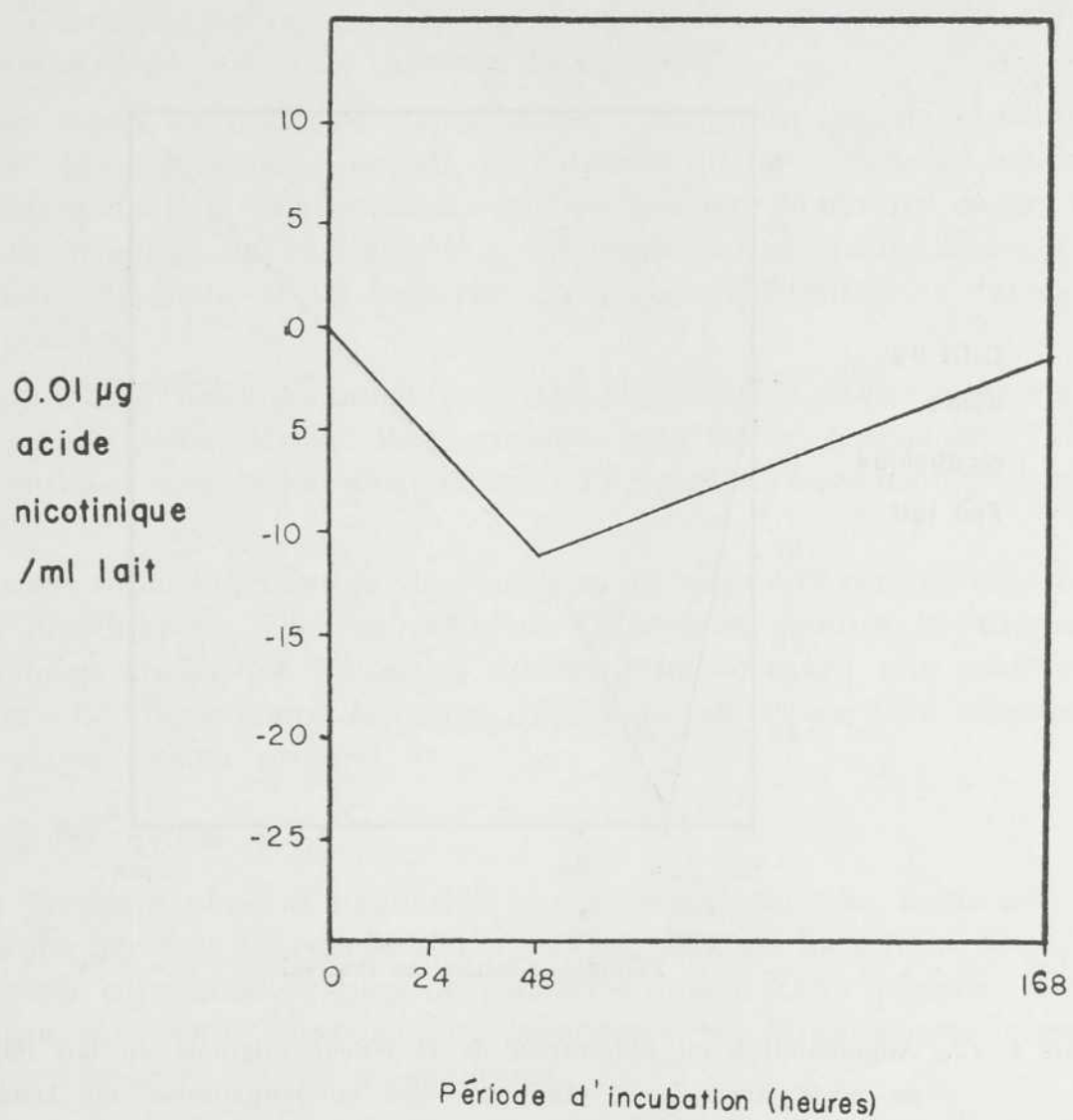


Figure I-11. Augmentation ou diminution de la teneur originale du lait (O) en acide nicotinique. Influence des bactéries lactiques mésophiles B.

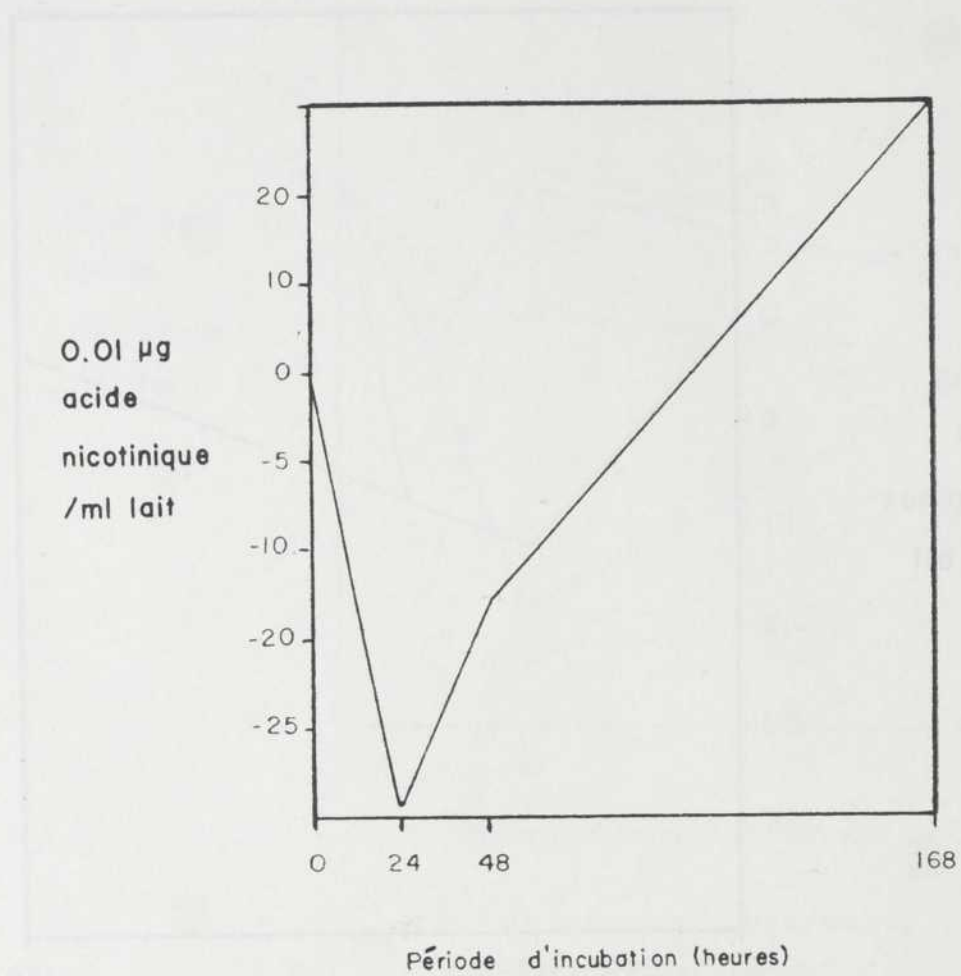


Figure I-12. Augmentation ou diminution de la teneur originale du lait (O) en acide nicotinique. Influence des microorganismes du kéfir.

DISCUSSION

Bactéries Thermophiles

Durant la première phase d'incubation, qui se termine par la coagulation du lait, les bactéries thermophiles puisent dans les réserves du milieu l'acide nicotinique nécessaire à l'utilisation du lactose. *Thermobacterium bulgaricum* se montre le plus exigeant durant cette période qui correspond à la phase logarithmique de croissance. Suivent, dans l'ordre de leurs exigences décroissantes, *Thermobacterium yoghourtii*, *Streptococcus thermophilus*, *Thermobacterium acidophilum* et les bactéries du yoghourt.

Pour toutes les bactéries thermophiles, l'utilisation d'acide nicotinique se continue durant la seconde période d'incubation qui se termine 24 heures après l'inoculation du lait. *Thermobacterium bulgaricum* se montre encore le plus exigeant ; *Streptococcus thermophilus*, *Thermobacterium acidophilum*, *Thermobacterium yoghourtii* et les bactéries du yoghourt manifestent des exigences moins grandes.

Durant la dernière période d'incubation, l'utilisation de la vitamine s'annule et l'on peut même déceler une synthèse, très faible cependant. Tous les thermophiles se comportent ainsi, excepté *Thermobacterium acidophilum* qui se maintient.

Durant toute l'incubation, les bactéries du yoghourt consomment très peu d'acide nicotinique. *Thermobacterium bulgaricum* montre les exigences les plus grandes, tandis que les autres thermophiles occupent une position intermédiaire. En aucun temps, la teneur du lait ne s'est élevée à un niveau égal ou supérieur au niveau original.

Bactéries Mésophiles A

La première phase d'incubation se caractérise par une utilisation d'acide nicotinique par tous les représentants de ce groupe de bactéries. *Streptococcus liquefaciens* consomme le plus de vitamine durant cette période. *Propionibacterium shermanii*, *Streptococcus paracitrovorus*, *Streptococcus cremoris* et *Streptococcus lactis* sont moins exigeants.

Durant la seconde période d'incubation, les bactéries se groupent différemment. *Propionibacterium shermanii* et *Streptococcus lactis* continuent à consommer la vitamine, tandis que toutes les autres bactéries ont tendance à la synthétiser. *Streptococcus liquefaciens*, le plus exigeant durant la phase précédente, en synthétise le plus. *Streptococcus paracitrovorus* et *Streptococcus cremoris* accomplissent une synthèse moindre.

On assiste à des bifurcations analogues durant la dernière phase d'incubation. *Streptococcus paracitrovorus*, *Streptococcus lactis* et *Streptococcus liquefaciens* consomment de l'acide nicotinique. *Streptococcus cremoris* et *Propionibacterium shermanii* en font la synthèse.

Il est difficile d'expliquer comment une bactérie peut utiliser l'acide nicotinique durant la première période, la synthétiser durant la seconde et l'utiliser de nouveau durant la dernière période. Ce fait peut être provoqué par la transformation de formes inactives en formes actives de la vitamine.

Bactéries Mésophiles B

Lactobacillus casei est le seul représentant de ce groupe de bactéries. Il utilise l'acide nicotinique durant les deux premières phases d'incubation qui se terminent 48 heures après l'inoculation. Une fois le lactose utilisé, le métabolisme glucidique ralentit et les cellules laissent diffuser la vitamine libre dans le milieu. La dernière période d'incubation se caractérise donc par un gain.

Microorganismes du kéfir

Les bactéries du kéfir doivent trouver dans le milieu la vitamine nécessaire à l'élaboration de leurs enzymes. La dégradation glucidique accomplie, les bactéries cessent leur activité et les levures entrent en action. Les levures synthétisent durant la seconde et la dernière phases d'incubation de grandes quantités d'acide nicotinique. Ces résultats corroborent les observations de Rogosa (1943) qui remarquait le pouvoir de synthèse des levures qui ne fermentent pas le lactose.

Toutes les bactéries lactiques à l'étude ont besoin d'acide nicotinique durant la première phase d'incubation qui se termine par la coagulation du lait et qui correspond à la phase logarithmique de croissance. Le métabolisme glucidique est à son maximum durant cette période et les cellules édifient leurs enzymes à partir de la vitamine du lait. L'acidité croît sans cesse jusqu'à inhiber la croissance des cellules. Durant la dernière phase d'incubation, les cellules semblent synthétiser quelque peu l'acide nicotinique, mais en quantités généralement trop faibles pour élever la concentration du lait à son niveau initial.

Il n'existe pas de corrélation entre l'acidité et la teneur vitaminique, mais l'acidité influence indirectement la synthèse en marquant le moment où les bactéries, inhibées par l'acidité, commencent à emmagasiner des réserves qui leur seront utiles lorsqu'on les inoculera dans un milieu frais.

CONCLUSION

Une étude historique de la biosynthèse de l'acide nicotinique nous a démontré l'utilité d'évaluer le pouvoir synthétique de plusieurs espèces de bactéries lactiques utilisées dans la préparation de laits fermentés, dans la fabrication de démarreurs et dans la maturation de fromages divers. Nous avons choisi 35 souches recrutées chez 12 espèces et associations microbiennes et déterminé leur influence sur la teneur du lait en acide nicotinique.

1. Toutes les bactéries lactiques à l'étude utilisent, sans exception, la vitamine du lait pour amorcer leur croissance et satisfaire aux besoins de leur mécanisme enzymatique durant la phase logarithmique de leur croissance, période qui correspond à la dégradation active du lactose.

2. Ces exigences se maintiennent durant la seconde phase d'incubation chez toutes les bactéries, excepté *Streptococcus liquefaciens*, *Streptococcus paracitrovorus* et *Streptococcus cremoris*, qui synthétisent. Les microorganismes du kéfir accomplissent aussi la synthèse.

3. La dernière période d'incubation se caractérise par une légère synthèse qui semble la manifestation d'une fonction de protection que l'on décèlera chez les mêmes bactéries étudiées dans leur comportement envers l'acide pantothénique. Dans le kéfir, la synthèse est le fait des levures qui produisent des quantités considérables de vitamine.

4. À la lumière des résultats obtenus, il n'est permis de saisir aucune corrélation entre l'acidité et la concentration vitaminique. Cependant, l'acidité semble favoriser indirectement la synthèse.

5. Des essais préliminaires nous ont révélé que la digestion acide, alcaline ou enzymatique du lait est inutile. La teneur par ml de lait s'établit en moyenne, dans nos expériences, à 0.83 microgramme.

BIBLIOGRAPHIE

- ASSOCIATION OF VITAMIN CHEMISTS, INC. (The) 1951 *Methods of Vitamin Assay*. Interscience Publ., Inc., New York.
- BALLIF, L., LWOFF, A., QUERIDO, A., et ORNSTEIN, I. 1939 La nicotinamidémie chez les pellagres. *Compt. rend. soc. biol.*, **131**, 903.
- BANDIER, E., et HALD, J. 1939 Estimation of nicotinic acid. *Biochem. J.*, **33**, 264.
- BETHKE, R. M. 1946 Intestinal synthesis of vitamins. *Flour and Feed*, **47**, 50.
- BRIGGS, A. R., SINGAL, S. A., et SYDENSTRICKER, V. R. 1945 A study of nicotinic acid restriction in man, *J. Nutrition*, **29**, 331.
- BURKHOLDER, P. R., et McVEIGH, I. 1942 Synthesis of vitamins by intestinal bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.*, **28**, 285.
- CHELDELIN, V. H., et WILLIAMS, R. R. 1942 *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **14**, 671-675.
- DANN, W. J., et HANDLER, P. 1941 Quantitative estimation of nicotinic acid in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **140**, 201.
- DORFMAN, A., KOSER, S. A., HORWITT, M. K., BIRKMAN, S., et SAUNDERS, F. 1940 *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **43**, 434.
- ELLINGER, P., et BENESCH, R. 1945 Biosynthesis of nicotinamide in the human gut. *Lancet*, **48**, 432.
- ELLINGER, P., et COULSON, R. A. 1944 *Biochem. J.*, **38**, 265.
- ELLINGER, P., COULSON, R. A., et BENESCH, R. 1944 *Nature*, **154**, 270.
- ELLINGER, P., KADER, M. M., ABDEL, S., et EMMANUELOWA, A. 1947 *Brit. J. Exptl Pathol.*, **28**, 261.

- ELVEHJEM, C. A. 1946 The role of intestinal bacteria in nutrition. *J. Am. Dietet. Assoc.*, **22**, 959.
- FILDES, P. 1938 The growth of *Proteus* on ammonium lactate plus nicotinic acid. *Brit. J. Exptl Pathol.*, **19**, 240.
- FRAENKEL, G., et BLEWETT, M. 1943a *Biochem. J.*, **37**, 686.
- FRAENKEL, G., et BLEWETT, M. 1943b *Nature*, **152**, 506.
- GROSSOWICZ, H., et SHERTINSKY, E. 1947 *J. Biol. Chem.*, **167**, 101.
- GYORGI, P. 1950 *Vitamin Methods*, **I**. Academic Press.
- HARRIS, L. J., et RAYMOND, W. D. 1939 Assessment of the level of nutrition. A method for the estimation of nicotinic acid in urine. *Biochem. J.*, **33**, 2037.
- ISELL, H., WOOLLEY, J. G., BUTLER, R. E., et SEBRELL, W. H. 1941 *J. Biol. Chem.*, **139**, 499.
- JOHNSON, B. C. 1945 *J. Biol. Chem.*, **159**, 227.
- JOHNSON, R., WIESE, A. C., MITCHELL, H. H., et NIVENS, W. B. 1947 The metabolism of nicotinic acid and its role in the nutrition of the calf. *J. Biol. Chem.*, **167**, 729.
- KITAY, Estelle, et SNELL, E. E. 1948 Effect of size of inoculum of the apparent vitamin requirements of lactic acid bacteria. *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **68**, 648.
- KLIGER, I. J., et GROSSOWICZ, N. 1938 Nicotinic acid and the fermentation of dextrose by the Colon-Typhoid group of bacteria. *Nature*, **142**, 76.
- KLIGER, I. J., et GROSSOWICZ, N. 1939 The influence of nicotinic acid on glucose fermentation by members of Colon-Typhoid group of bacteria. *J. Bacteriol.*, **38**, 309.
- KLIGER, I. J., et GROSSOWICZ, N. 1940 Function of nicotinic acid in bacterial metabolism of the Colon-Typhoid group of bacteria. *Nature*, **146**, 652.
- KLIGER, I. J., et GROSSOWICZ, N. 1941 The function of nicotinic acid in bacterial metabolism. *J. Bacteriol.*, **42**, 173.
- KLIGER, I. J., GROSSOWICZ, N., et BERGNER, S. 1943 Inhibition of bacterial growth by glucose in media devoid of nicotinic acid. *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **52**, 332.
- KNIGHT, B. C. J. G. 1937 The nutrition of *Staphylococcus aureus*, Nicotinic acid and Vitamin B₁. *Biochem. J.*, **31**, 731.
- KNIGHT, B. C. J. G., HARRIS, R. S., et THIMANN, R. V. 1945 *Vitamins and Hormones*, **3**, 106. Interscience Publ., New York.
- KODICEK, E. 1940 *Biochem. J.*, **34**, 712-723.
- KODICEK, E. 1940 *Biochem. J.*, **34**, 724-735.
- KOSER, S. A., et BAIRD, G. R. 1944 Bacterial destruction of nicotinic acid. *J. Infectious Diseases*, **75**, 250.
- KOSER, S. A., BERKMAN, S., et DORFMAN, A. 1941 Comparative activity of nicotinic acid and nicotinamide as growth factors for microorganisms. *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **47**, 504.
- KOSER, S. A., et WRIGHT, M. H. 1943a Experimental variation of nicotinamide requirements of Dysentery Bacilli. *J. Bacteriol.*, **46**, 239.
- KOSER, S. A., et WRIGHT, M. H. 1943b Vitamin requirements of *Torula cremoris*. *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **53**, 249.
- KREHL, W. A., ELVEHJEM, C. A., et STRONG, F. M. 1944 *J. Biol. Chem.*, **156**, 13.
- KREHL, W. A., TEPLY, L. J., et ELVEHJEM, C. A. 1945a Corn as an etiological factor in the production of a nicotinic acid deficiency in the rat. *Science*, **101**, 283.

- KREHL, W. A., TEPLY, L. J., et ELVEHJEM, C. A. 1945b Effect of corn grits on nicotinic acid requirement of the dog. *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **58**, 334.
- KRUEGER, Keatha K., et PETERSON, W. H. 1948 The nutritional requirements of *Lactobacillus pentosus* 124-2. *J. Bacteriol.*, **55**, 683.
- LANDY, M., et DICKEN, D. M. 1942 *J. Lab. Clin. Med.*, **27**, 1086.
- LAWRENCE, J. M., HERRINGTON, B. L., et MAYNARD, L. A. 1946 The nicotinic acid, biotin, pantothenic acid content of cow's milk. *J. Nutrition*, **32**, 73-91.
- LUNDQUIST, N. S., et PHILLIPS 1943 Certain dietary factors essential for the growing calf. *J. Dietet. Sci.*, **26**, 1023.
- LWOFF, A., et QUERIDO, M. 1938 *Compt. rend. soc. biol.*, **129**, 1039.
- MARTINEK, R. G., KIRCH, E. R., et WEBSTER, G. L. 1943 Determination of nicotinic acid. *J. Biol. Chem.*, **149**, 245.
- MELNICK, D., et FIELD, H., Jr. 1940 Chemical determination of nicotinic acid: inhibitory effect of cyanogen bromide upon the analine side reactions. *J. Biol. Chem.*, **135**, 53.
- MELNICK, D., ROBINSON, W. D., et FIELD, H., Jr. 1940 *J. Biol. Chem.*, **138**, 131-144.
- MITCHELL, H. K., et ISBELL, E. R. 1942 *Univ. Texas Publ. No.* **4237**, 125.
- NAJJAR, V. A., HOLT, L. E., Jr., JOHNS, G. A., MEDIARY, C. C., et FLEISCHMANN, G. 1946 Biosynthesis of nicotinamide in man. *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **61**, 371.
- NIVEN, C. F., Jr. 1944 Nutrition of *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.*, **47**, 343.
- NIVEN, C. F., Jr., WASHBURN, Mary R., et WHITE, J. C. 1948 Nutrition of *Streptococcus bovis*. *J. Bacteriol.*, **55**, 601.
- OLDHAM, H. G., DAVIS, M. V., et ROBERTS, L. J. 1946 Thiamine excretions and blood levels of young women on diets containing varying levels of the B vitamins, with some observations on niacin and pantothenic acid. *J. Nutrition*, **31**, 163.
- PEARSON, P. B., SCHMIDT, H., et MACKEY, A. A. 1939 *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **40**, 423.
- PEARSON, P. B., WINEGAR, A. H., et SCHMIDT, H. 1940 Studies on the metabolism of nicotinic acid in the sheep. *J. Nutrition*, **20**, 551.
- PERLZWEIG, W. R., ROSEN, F., LEVITAS, Nora, et ROBINSON, J. 1947 The excretion of nicotinic acid derivatives after ingestion of tryptophan by man. *J. Biol. Chem.*, **167**, 511.
- PETERSON, W. H., et PETERSON, M. S. 1945 Relation of bacteria to vitamins and other growth factors. *Bacteriol. Revs.*, **9**, 49.
- RANG, L., et SUBBAROW, J. 1938 Studies on the nutritional requirements of Hemolytic Streptococci. I: Effect of various substances from liver extract on Hemolytic Streptococci. *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **38**, 837.
- ROBBINS, W. J., et KAVANAGH, V. 1942 Vitamin deficiencies on the Filamentous Fungi. *Botan. Rev.*, **8**, 411.
- ROBINSON, F. A. 1951 *The Vitamin B Complex*. Chapman & Hall, London.
- ROGOSA, M. 1943 Nicotinic acid requirements of certain Yeasts. *J. Bacteriol.*, **46**, 435.
- ROGOSA, M. 1944 Vitamin requirements of Lactose-Fermenting and certain other Yeasts. *J. Bacteriol.*, **47**, 159.
- RUBINSTEIN, D., et SHEKUN, N. 1939 *Nature*, **143**, 1064.
- SCHAEFER, A. E., McKIBBIN, J. M., et ELVEHJEM, C. A. 1942 *J. Biol. Chem.*, **144**, 679.

- SHANKMANN, S., CAMIEN, M. N., BLACK, H., MARRIFIELD, R. B., et DUNN, M. S. 1947 Vitamin requirements of twenty-three Lactic Acid Bacteria. *J. Biol. Chem.*, **168**, 23.
- SHOURIE, K. L., et SWAMINATHAN, M. 1940 *Ind. J. Med. Research*, **27**, 679.
- SNELL, E. E. 1945 The nutritional requirement of the Lactic Acid Bacteria and their application to biochemical research. *J. Bacteriol.*, **50**, 373.
- SNELL, E. E., STRONG, F. M., et PETERSON, W. H. 1938 Pantothenic and nicotinic acids as growth factors for Lactic Acid Bacteria. *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 2825.
- SNELL, E. E., STRONG, F. M., et PETERSON, W. H. 1939 Growth factors for Bacteria, VIII. Pantothenic and nicotinic acids as essential growth factors for Lactic and Propionic Acid Bacteria. *J. Bacteriol.*, **38**, 293.
- SNELL, E. E., et WRIGHT, L. 1941 *J. Biol. Chem.*, **139**, 675-685.
- STARKEY, R. L. 1944 The transformation of certain vitamins of the B complex during decomposition under aerobic and anaerobic conditions. *J. Bacteriol.*, **47**, 312.
- SULLIVAN, R. A., BLOOM, E., et JARMOL, J. 1943 The value of dairy products in nutrition. III. The riboflavin, pantothenic acid, nicotinic acid and biotin content of several varieties of cheese. *J. Nutrition*, **25**, 463.
- TATUM, E. L., et BEADLE, G. W. 1942a The Relation of genetics to growth factors and hormones. *Growth (Suppl.)*, **6**, 27.
- TATUM, E. L., et BEADLE, G. W. 1942b Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proc. Natl Acad. Sci.*, **28**, 234.
- TATUM, E. L., et BONNER, D. 1943 *J. Biol. Chem.*, **151**, 349.
- TATUM, E. L., et BONNER, D. 1944 *Proc. Natl Acad. Sci.*, **30**, 30.
- TATUM, E. L., BONNER, D., et BEADLE, G. W. 1944 *Arch. Biochem.*, **3**, 477.
- THOMPSON, R. C. 1942 Synthesis of B Vitamins by Bacteria in pure culture. Univ. Texas Publ. No. 4237, 87.
- UMBREIT, W. W., WOOD, W. A., et GUNZALUS, I. C. 1946 *J. Biol. Chem.*, **165**, 731.
- VONGERICKTEN, E. 1899 *Ber.*, **32**, 2571.
- WAISMAN, H. A., MICHELSEN, O., McKIBBIN, J. M., et ELVEHJEM, C. A. 1940 *J. Nutrition*, **19**, 483.
- WEGNER, M. I., BOOTH, A. M., ELVEHJEM, C. A., et HART, E. B. 1940 Rumen synthesis of the Vitamin B Complex. *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **45**, 769.
- WEGNER, M. I., BOOTH, A. M., ELVEHJEM, C. A., et HART, E. B. 1941 Rumen synthesis of the Vitamin B Complex on natural rations. *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **47**, 90.
- WILLIAMS, R. J. 1941 *Biol. Revs.*, **16**, 49.
- WILLIAMS, R. J. 1942 Univ. Texas Publ. No. 4237, 7-13.
- WILLIAMS, R. J., EAKIN, R. E., BEERSTECHEER, E., et SHIVE, W. 1950 *The Biochemistry of B Vitamins*. Reinhold Publ. Corp., New York.
- WILLIAMS, W. L. 1946 *J. Biol. Chem.*, **166**, 397.
- WINEGAR, A. H., PEARSON, P. B., et SCHMIDT, H. 1940 The synthesis of nicotinic acid in the body of sheep. *Science*, **91**, 508.

V

INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA
TENEUR DU LAIT EN ACIDE PANTOTHÉNIQUE

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

CHICAGO, ILLINOIS

1900

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

CHICAGO, ILLINOIS

1900

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

CHICAGO, ILLINOIS

1900

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

CHICAGO, ILLINOIS

1900

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

CHICAGO, ILLINOIS

1900

THE UNIVERSITY OF CHICAGO PRESS

CHICAGO, ILLINOIS

1900

V

INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA TENEUR DU LAIT EN ACIDE PANTOTHÉNIQUE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

L'alimentation humaine et animale comprend de nombreux aliments qui ont subi à des degrés divers l'action des microorganismes. Le lait en est un. Ce serait un grand avantage pour l'industrie laitière si les ferments lactiques, intervenant dans la transformation du lait en produits variés, devenaient des agents de synthèse vitaminique. L'avantage serait plus grand encore s'ils s'établissaient en permanence dans l'intestin et synthétisaient sur place les substances vitaminiques essentielles.

Plusieurs chercheurs ont étudié la synthèse des vitamines par les bactéries lactiques cultivées dans des milieux purifiés, mais rarement les a-t-on observées dans leur milieu naturel, le lait. L'objet de la présente étude est de déterminer l'influence des bactéries lactiques sur la teneur du lait en acide pantothénique.

Ce travail débute par un relevé bibliographique des recherches effectuées dans les domaines de la synthèse de l'acide pantothénique par les différentes classes de microorganismes et de sa synthèse intestinale chez les monogastriques et les polygastriques. Nous étudierons ensuite quelques espèces microbiennes parmi les bactéries lactiques les plus répandues dans l'industrie, et nous tenterons d'établir leur influence sur la teneur du lait en acide pantothénique.

RÔLE DES PROTOZOAIRE

Williams *et al.* (1936) ont montré que l'acide pantothénique est essentiel à un grand nombre de protozoaires et Garnjobst *et al.* (1943) ont confirmé ces résultats. Mais on ignore à peu près tout de la biosynthèse de la vitamine B₃ par cette classe de microorganismes.

Lwoff et Dusi (1938) réussirent cependant la culture de *Polytoma obtusum* et *Polytoma uvella* dans un milieu contenant de l'acétate d'ammonium, du diphosphate de potassium, du chlorure de calcium et du citrate de fer.

L'acide pantothénique est nécessaire aux genres *Trichomonas* (Kupferberg *et al.*, 1948) et *Strigomonas* (Lwoff, 1951) et aux espèces *Plasmodium gallinaceum* et *Plasmodium lophurae in vivo* (Lwoff, 1951). *Tetrahymena geleii* (Lwoff, 1951) dépend aussi d'une source extérieure de vitamine B₃; son mode de nutrition est très semblable à celui des animaux supérieurs, mais il est pourtant incapable d'utiliser la coenzyme A.

RÔLE DES MOISSURES

Williams *et al.* (1933) reconnurent que l'acide pantothénique est un facteur essentiel à plusieurs espèces de moisissures mais qu'une souche d'*Aspergillus niger* le synthétise. Plusieurs années plus tard, Wooster et Cheldelin (1945) décélèrent l'action stimulante de la vitamine B₃ sur la croissance de *Penicillium digitatum* et Tanner *et al.* (1945) remarqueront la synthèse chez *Penicillium chrysogenum*.

À la même époque, Nielsen et Hartelius (1945) annoncèrent la découverte de six espèces de moisissures capables de synthétiser l'acide pantothénique : *Aspergillus niger*, *Penicillium wolkmanni*, deux espèces indéterminées du genre *Penicillium*, *Rhizopus suinus* et *Rhizopus nigricans*.

Wagner et Guirard (1948), s'inspirant des techniques mises au point par Beadle et Tatum (1949) pour l'étude de la génétique des moisissures et de leur comportement envers les vitamines, obtinrent une souche de *Neurospora* produisant de grandes quantités d'acide pantothénique à partir de la pantolactone et de la β -alanine, et une autre souche, ne différant de la première que par un seul gène, impuissante à accomplir la synthèse dans les mêmes conditions (Foster, 1949).

RÔLE DES LEVURES

Williams et Truesdail (1931) et Williams *et al.* (1933) décelèrent l'action d'une substance simple qui stimulait la croissance des levures et qu'ils nommèrent acide pantothénique avant même la découverte de sa structure chimique. Williams *et al.* (1936) observèrent plus tard que la β -alanine, un acide aminé, jouissait de la même activité, mais ils n'identifièrent pas la β -alanine à l'acide pantothénique, parce que l'addition d'asparagine au milieu de culture inhibait l'action de la β -alanine sans inactiver l'action de l'acide pantothénique. On arriva alors à la conclusion que la β -alanine était probablement un précurseur de la vitamine, et que ses analogues, les autres acides aminés (Sarett et Cheldelin, 1945a, 1945b) et l'acide propionique (King et Cheldelin, 1948) prévenaient la synthèse de la vitamine à partir de la β -alanine.

La levure peut donc synthétiser l'acide pantothénique à condition que la vitamine soit absente du milieu de culture (Williams *et al.*, 1936). Si la β -alanine est présente, la synthèse se fera *ad libitum* (Weinstock *et al.*, 1939).

Après la découverte de la structure de la vitamine, Williams *et al.* (1938, 1940) étudièrent la nécessité de l'inositol, de la thiamine, de la biotine, de l'acide pantothénique et de la vitamine B₆ pour trois souches de *Saccharomyces cerevisiae*. Seul l'acide pantothénique s'avéra essentiel pour amorcer et assurer la croissance chez les trois souches. La β -alanine pouvait remplacer la vitamine dans tous les cas. Plusieurs travaux vinrent confirmer ces observations et on releva une liste imposante de levures qui se comportaient comme les souches de *Saccharomyces cerevisiae*. Williams (1941) en fit le dénombrement.

Les levures osmophiles devinrent ensuite un sujet d'étude et Lockhead et Landerkin (1942) utilisèrent 23 souches choisies parmi 18 espèces de *Zygosaccharomyces*. L'acide pantothénique ou la β -alanine affichèrent leur action stimulante chez la moitié des souches. Chez plusieurs, on remarqua l'effet combiné de l'inositol, de la biotine et de l'acide pantothénique.

Koser et Wright (1943), en relevant les exigences nutritives de *Torula cremoris*, conclurent que la nicotinamide, la biotine, le pantothénate de calcium et la thiamine étaient essentiels à la croissance rapide de cet organisme cultivé dans un milieu basal contenant des sels inorganiques, du glucose et du phosphate d'ammonium ou des acides aminés.

Burkholder (1943) ainsi que Schultz et Atkin (1947) ont dressé la liste des levures pour lesquelles l'acide pantothénique est essentiel: *Candida pseudotropicalis*, *Mycoderma valida*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*, *Saccharomyces chodati*, *Saccharomyces fragilis*, *Saccharomyces logos*, *Saccharomyces macedoniensis*, *Saccharomyces oviformis*, *Saccharomyces tubiformis*, *Saccharomycodes ludwigii*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Zygosaccharomyces barkeri*, *Zygosaccharomyces mandshuricus*, *Zygosaccharomyces nadsoni*, *Zygosaccharomyces pastori*, *Zygosaccharomyces priorianus*, *Zygosaccharomyces felsineus*, *Zygosaccharomyces marxianus*, *Zygosaccharomyces variabilis*, *Zygosaccharomyces japonicus*, *Torulopsis sphaerica*, *Saccharomyces chevalieri*, *Saccharomyces behrensianus*, *Saccharomyces anomalus belgicus*, *Saccharomyces bacillaris*, *Saccharomyces exiguus*, *Torula thermantitoneum*, *Torula colliculosa*, *Torula cremoris* et *Kloeckera brevis*.

On voit que l'acide pantothénique est essentiel à la plupart des levures, mais que la β -alanine peut toujours le remplacer. La levure possède donc le pouvoir d'unir la β -alanine à l'acide α - γ -dihydroxylique (qu'elle synthétise toujours) pour reconstituer l'acide pantothénique. Si la β -alanine est trop abondante dans le milieu de culture, l'acide dihydroxylique n'est pas synthétisé assez rapidement. L'addition de cet acide accélérera (Hartelius et Johansen, 1946) l'utilisation de la β -alanine et la synthèse de la vitamine.

Le facteur *Lactobacillus bulgaricus* et la coenzyme A n'ont peu (Craig et Snell, 1951) ou pas (McRorie et Williams, 1951) d'effet sur la levure qui ne peut probablement pas accepter ces substances à travers sa membrane. La levure synthétise pourtant la coenzyme A au sein de sa cellule, car la phénylpantothe-

none, qui inhibe la synthèse de la coenzyme à partir de la vitamine, arrête complètement l'acétylation chez la levure.

RÔLE DES BACTÉRIES

Snell *et al.* (1938) furent les premiers à saisir l'action stimulante de l'acide pantothénique chez les bactéries et à identifier ce stimulus à celui de l'extrait de foie de Williams chez ces microorganismes. Mueller et Klotz (1938) isolèrent bientôt deux souches de *Corynebacterium diphtheriae* dont l'une s'accommodait de la β -alanine et l'autre, la souche Allen, préférait la vitamine à la β -alanine. Snell *et al.* (1939) ne purent confirmer ce phénomène chez les bactéries lactiques qui exigent la vitamine intacte. On interrogea alors un grand nombre d'espèces bactériennes sur leurs exigences et l'on reconnut plusieurs variantes qu'il convient d'étudier sous les titres suivants :

Bactéries exigeant la vitamine intacte

Peterson et Peterson (1945) rapportent 52 bactéries pour lesquelles l'acide pantothénique est essentiel, mais ne font pas de distinction entre la molécule intacte et ses précurseurs. Les bactéries lactiques y sont largement représentées : *Lactobacillus arabinosus* (Snell *et al.*, 1938, 1939), *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus lactis*, (Snell *et al.*, 1938), *Lactobacillus pentosus* (Krueger et Peterson, 1948 ; Snell *et al.*, 1938), *Leuconostoc mesenteroides* (Snell *et al.*, 1938, 1939), *Leuconostoc dextranicum* (Whiteside-Carlson et Rosano, 1951), *Streptobacterium plantarum*, *Streptococcus lactis* (Snell *et al.*, 1938), *Bacillus brassicae* (Robinson, 1951) et plusieurs autres (Knight, 1945 ; Snell *et al.*, 1938, 1939). Les bactéries propioniques, les streptocoques (SubbaRow et Trager, 1943 ; Woolley et Hutchings, 1939) et les microcoques ne sont pas moins exigeants (Knight, 1945 ; Peterson et Peterson, 1945 ; Rosenberg, 1945 ; Porter, 1948). La vitamine est aussi essentielle à plusieurs espèces de *Pasteurella* (Berkman, 1942) et de *Brucella* (Koser *et al.*, 1941), à plusieurs souches exigeantes de *Corynebacterium diphtheriae* (Evans *et al.*, 1939 ; Mueller et Klotz, 1938), à *Streptococcus haemolyticus* et *Diplococcus pneumoniae* (Rane et SubbaRow, 1940) ainsi qu'à *Proteus morganii*, *Clostridium tetani*, *Clostridium welchii* et *Shigella paradysenteriae* (Robinson, 1951).

Bactéries synthétisantes

Bactéries capables d'accomplir la synthèse totale. Thompson (1942) reconnut la synthèse totale de la vitamine B₃ chez les espèces *Aerobacter aerogenes*, *Clostridium butylicum*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens* et *Serratia marcescens*. Peterson et Peterson (1945) mentionnent aussi *Azotobacter vinelandii*, *Phytomonas tumefaciens*, *Rhizobium meliloti* et un autotrophe : *Thiobacillus thiooxydans*. McBurney *et al.* (1935) obtiennent des résultats identiques avec les bactéries symbiotiques des légumineuses.

Bactéries capables d'accomplir la synthèse partielle. Koser *et al.* (1941) isolèrent une souche de *Brucella suis* qui peut, contrairement aux autres représentants du genre, s'accommoder de la β -alanine seule, de l'acide pantoïque seul ou mieux des deux précurseurs de la vitamine. *Corynebacterium diphtheriae* présente des variantes encore plus grandes : plusieurs souches des variétés *intermedius*, *mitis* (Evans *et al.*, 1939 ; Mueller et Klotz, 1938) et *gravis* (Evans *et al.*, 1939 ; McIlwain, 1943) requièrent la β -alanine et synthétisent l'acide pantothénique dans certains cas. Ces organismes sont impuissants à réaliser la synthèse de la β -alanine, mais produisent l'acide pantoïque et savent l'unir à la β -alanine. West et Wilson (1940) observent une activité identique chez *Rhizobium trifolii*.

Acetobacter suboxydans ATCC 621 (Sarett et Cheldelin, 1945a, 1945b ; Underkoffler *et al.*, 1943) et *Streptococcus hemolyticus* H69D (Woolley, 1939) sont impuissants à synthétiser l'acide pantoïque. Ce précurseur est aussi la seule portion essentielle à *Clostridium septicum* (Ryan *et al.*, 1945) qui produit la β -alanine et peut l'unir à l'acide pantoïque pour synthétiser la vitamine. Ryan *et al.* (1947) étudièrent deux autres souches de cet organisme : la première est impuissante à synthétiser l'acide pantoïque, mais peut utiliser la pantoyletaurine de sodium, le γ -hydroxy-pantoate de sodium et l'amide pantoïque. La seconde est totalement indépendante. Un cas semblable se présente chez *Escherichia coli* (Ackermann et Shive, 1948) qui utilise la pantonine aussi facilement que l'acide pantothénique. La pantonine est donc un précurseur de l'acide pantoïque. *Acetobacter suboxydans* n'utilise pas ce précurseur et requiert alors l'acide pantoïque (Sarett et Cheldelin, 1945a, 1945b ; Underkoffler *et al.*, 1943). Les travaux de Snell (1946) ont entièrement confirmé ces résultats.

Bactéries utilisant les formes conjuguées de la vitamine B₃. Depuis la découverte d'un facteur essentiel à *Lactobacillus bulgaricus* (Williams *et al.*, 1949). Kitay et Snell (1950) ont voulu se rendre compte de son activité chez 15 souches de bactéries lactiques recrutées dans les espèces *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. delbrueckii* et *L. helveticus*. Dans tous les cas, la pantéthine est essentielle, et seul un taux élevé de pantothénate de calcium peut se substituer au LBF pour *Lactobacillus bulgaricus* (McRorie *et al.*, 1950). Des déterminations précises démontrent que LBF accuse une activité 75 à 500 fois plus grande que la vitamine envers *Lactobacillus helveticus* 80 (Brown *et al.*, 1950) ; son activité n'est que 8% celle de la vitamine envers *Lactobacillus arabinosus* (McRorie et Williams, 1951) ; LBF se substitue exactement à l'acide pantothénique pour *Lactobacillus casei* (McRorie et Williams, 1951) et pour *Lactobacillus bifidus* isolé des fèces des enfants nourris au sein (Hassinen *et al.*, 1951).

King *et al.* (1949) ont récemment découvert un conjugué de l'acide pantothénique (PAC) plus actif que la vitamine pour *Acetobacter suboxydans*, *Escherichia coli* et *Aerobacter aerogenes*. Ce conjugué semble différent de la coenzyme A (Nishi *et al.*, 1950).

Craig et Snell (1951) relèvent l'activité relative de la pantéthine (LBF), de l'acide pantothénique et de la coenzyme A chez six souches de levures et seize souches de bactéries lactiques. La coenzyme n'atteint qu'une activité de 1% de celle de la vitamine pour toutes les cultures excepté celles de *Lactobacillus acidophilus* (Nishi *et al.*, 1950) qui répondent par une croissance 0.76 à 3.3 fois plus grande. LBF n'est pas plus actif que la coenzyme pour les six levures, mais son activité chez les bactéries s'avère 0.05 fois (*Lactobacillus fermenti*) à 400 fois (*Lactobacillus delbrueckii*) plus grande que celle de l'acide pantothénique.

La thiamine et la choline semblent se substituer à l'acide pantothénique pour *Clostridium botulinum* Type A. En réalité, cette bactérie a besoin de ces trois facteurs qu'elle emmagasine avec difficulté. Lors de l'ensemencement, l'inoculum contient probablement assez de vitamine B₃, mais non des deux autres facteurs. Il suffit donc de les ajouter au milieu pour amorcer la croissance. L'organisme accomplit par la suite la synthèse des trois facteurs (Lamanna et Lewis, 1946).

Il est possible, dans certains cas, que l'acide pantothénique se comporte comme un aliment carboné : en effet, d'après Metzger (1947), *Pseudomonas* sp. croît dans une solution inorganique enrichie d'acide pantothénique, qui subit une décomposition oxydative.

BIOSYNTÈSE INTESTINALE

On sait depuis longtemps que les microorganismes sont très utiles à la vie des animaux supérieurs (Pasteur, 1885) par suite de leurs activités dans le tube digestif (Metchnikoff, 1901) ; ce concept se précisa lorsque Cooper (1914) attribua cette symbiose bienfaisante à la synthèse des vitamines B par les bactéries intestinales. Plusieurs observations ont par la suite appuyé ces assertions, mais les preuves s'établirent difficilement à cause des techniques laborieuses et souvent incertaines qu'entraînent ces recherches. L'élevage des animaux en milieu stérile semble la technique la plus séduisante (Nuttall et Thierfelder, 1895), mais peu de chercheurs l'ont pratiquée, car les améliorations qu'elle nécessite se sont longtemps fait attendre (Reyniers, 1946).

La vitamine B₃ est essentielle au cheval (Pearson et Schmidt, 1948), au porc (Hugues et Ittner, 1942), au chien (Schaefer *et al.*, 1942), au rat (El-Sadr *et al.*, 1939; Oleson *et al.*, 1939; SubbaRow et Rane, 1939), à la souris (Sandza et Lepold, 1941; Woolley, 1941, 1942) et au poulet (Jukes, 1939; Kratzer et Williams, 1948; Snell *et al.*, 1940) qui sait aussi utiliser la coenzyme A (Hegsted et Lipman, 1948) et le LBF (Rasmussen *et al.*, 1950). Chez les monogastriques, le caecum est le principal lieu de synthèse des vitamines. Le rat ne fait pas exception et on estime (Dann, 1941) à 10 à 60% de l'absorption totale la quantité de vitamines qui y sont synthétisées. Mitchell et Isbell (1942), en étudiant le sort des vitamines dans le caecum, s'aperçurent que la thiamine, la riboflavine, l'inositol, l'acide

nicotinique et l'acide pantothénique demeurent fermement liés aux cellules bactériennes, tandis que les autres vitamines B diffusent librement dans le milieu. Pourtant l'acide pantothénique produit par synthèse caecale représente encore 11 à 58% de la vitamine totale absorbée. Il semble que les antibiotiques servis dans les rations permettront de récupérer une fraction encore plus grande d'acide pantothénique. Les bactéries détruites libéreront la vitamine sous forme de PAC ou de LBF probablement, mais le rat peut utiliser ces formes à l'état conjugué (King *et al.*, 1950 ; McRorie et Williams, 1951).

Gall *et al.* (1948) rapportent la synthèse intestinale de la riboflavine et de l'acide pantothénique chez une race de souris résistante aux tumeurs mammaires. Un témoin, appartenant à la race albinos, se montre beaucoup plus susceptible. L'analyse bactériologique des fèces et les essais *in vitro* des bactéries isolées révèlent, chez la souche résistante, la présence d'une flore synthétisante beaucoup plus puissante que celle de la race albinos.

Le cheval héberge aussi des flores caecale et intestinale capables de synthétiser plusieurs vitamines B, l'acide pantothénique en particulier. (Carroll *et al.*, 1949).

On a consacré bien des efforts à l'isolement des bactéries intestinales synthétisantes. La difficulté de reproduire *in vitro* les conditions intestinales fut la cause de nombreux succès. Dans un de leurs rapports, Burkholder et McVeigh (1939) citent des isollements fructueux. *Aerobacter aerogenes* et *Proteus vulgaris* comptent parmi les six espèces bactériennes synthétisantes isolées.

BIOSYNTHÈSE CHEZ LES RUMINANTS

La difficulté d'isoler les protozoaires et les bactéries du rumen n'a pas encore permis de déterminer avec certitude le genre ni même le groupe d'organismes synthétisants. Il n'a pas toujours été facile non plus de connaître les facteurs synthétisés dans le rumen. McElroy et Goss (1939) ont cependant prouvé la synthèse de l'acide pantothénique dans le rumen de la brebis. Peu après, ils observaient le même fait chez la vache (McElroy et Goss, 1941). Dans les deux cas, la teneur du lait en vitamine B₃ servit de critère : elle s'établit à un niveau deux fois plus élevé que dans la ration. Wegner *et al.* (1941) rapportent les mêmes résultats dans le rumen de jeunes veaux. Enfin, Lardinois *et al.* (1944) répétèrent les expériences, et la synthèse s'avéra toujours indéniable.

BIOSYNTHÈSE CHEZ L'HOMME

On possède la preuve directe de la synthèse intestinale de l'acide pantothénique chez l'homme. En effet, Denko *et al.* (1946) ont démontré que l'excrétion fécale et urinaire de la vitamine excède toujours le contenu alimentaire, quelle que soit la teneur du menu. L'usage des analogues inhibiteurs conduit aux mêmes conclusions (Wilson et Miles, 1948). L'administration de la vitamine ou du pantothénol (Hegsted, 1948 ; Rubin *et al.*, 1948) augmente la teneur du sang

(Spies *et al.*, 1940) et celle de l'urine, même si la diète ne contient pas la vitamine, mais la teneur des fèces demeure inchangée (Robinson, 1951). Un fait demeure donc sans preuve : l'utilisation de l'acide pantothénique synthétisé par les bactéries intestinales.

On a consacré de nombreux efforts à l'isolement des bactéries intestinales synthétisantes. *Escherichia coli* et *Aerobacter aerogenes* accomplissent la synthèse *in vitro*. Chez les enfants nourris au sein, on a remarqué depuis longtemps la prédominance intestinale de *Lactobacillus bifidus*. Depuis que Norris *et al.* (1950) ont mis au point un milieu de culture approprié, Hassinen *et al.* (1951) ont étudié les exigences de cet organisme et ont constaté que l'acide pantothénique ou le LBF sont essentiels *in vitro*. On ne peut donc pour le moment attribuer à *Lactobacillus bifidus* un rôle intestinal synthétisant.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE L'INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA TENEUR DU LAIT EN ACIDE PANTOTHÉNIQUE*

Ce travail a pour but d'apprécier l'effet des bactéries lactiques les plus utilisées en industrie laitière sur la teneur du lait en acide pantothénique et la relation entre l'acidité produite durant la fermentation lactique et la teneur en vitamine B₃.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cultures bactériennes

Les souches microbiennes à l'étude sont des cultures pures entretenues par des repiquages fréquents dans du lait écrémé stérile enrichi de 0.2% de levure et de 3% de carbonate de calcium. Nous avons recruté trois souches dans chacune des espèces suivantes : *Thermobacterium yoghourtii*, *T. bulgaricum*, *T. acidophilum*, *Streptococcus thermophilus*, *S. paracitrovorus*, *S. cremoris*, *S. lactis*, *S. liquefaciens*, *Lactobacillus casei* et *Propionibacterium shermanii*. Nous avons aussi utilisé trois souches de yoghourt et trois souches de kéfir. Ces associations comprennent respectivement les espèces suivantes : *Thermobacterium yoghourtii*, *T. bulgaricum*, *Streptococcus thermophilus*, ainsi que *Lactobacillus caucasicus*, *L. casei*, *Streptococcus kefir*, *Saccharomyces fragilis*, *Torula kefir*.

Pour chacune des 12 espèces et associations, nous inoculons en duplicata, avec 2% de culture de chacune des trois souches, six flacons de 100 ml de lait écrémé chauffé à 100 C pendant 30 minutes et refroidi à la température optimum d'incubation. Les duplicatas reçoivent 0.5% de chloroforme et constituent les témoins. Des échantillons sont immédiatement prélevés pour les déterminations de l'acidité et de la teneur vitaminique. Les six flacons demeurent à l'incubateur

*Travail exécuté en 1952.

jusqu'à coagulation, alors que de nouveaux échantillons sont prélevés. Les flacons sont conservés par la suite à la température de la chambre. Les déterminations sont reprises après 48 heures et une semaine d'incubation.

Choix de la méthode

Les méthodes de détermination de l'acide pantothénique sont nombreuses et se présentent sous trois grands titres. Les méthodes biologiques emploient le rat (Unna, 1940) ou mieux le poulet (Jukes, 1941) comme organismes d'essai, et sont certainement les plus exactes, puisqu'elles ne sont sensibles qu'aux seules formes biologiquement actives de la vitamine (Gyorgi, 1949 ; Hegsted, 1948 ; Williams *et al.*, 1950). Ces méthodes sont cependant lentes et coûteuses et se prêtent mal au protocole de nos expériences. Les méthodes chimiques sont les plus rapides. Leur principe repose sur la détermination de la β -alanine (Squalkowski *et al.*, 1950), ou de la pantoyl-lactone (Wollish et Schmall, 1950) après hydrolyse alcaline. Ces méthodes ne sont pas encore suffisamment éprouvées et aucune d'elles ne distingue entre les formes D- et L- de la vitamine : seule la forme D- est biologiquement active. De plus, la détermination de la β -alanine ne permet pas d'apprécier le pantothénol qui possède *in vivo* la même valeur que la vitamine (Hegsted 1948 ; Pfaltz, 1944). On se rallie de plus en plus aujourd'hui aux méthodes microbiologiques. Une méthode utilisant *Proteus morganii* ATCC No 8091 (Pelczar et Porter, 1941) a connu des succès, mais est tombée en désuétude. On a aussi mis au point une méthode avec *Saccharomyces carlsbergensis* 4228 ATCC 9080 (Atkin *et al.*, 1944), mais l'agitation mécanique durant l'incubation limite son emploi. La grande difficulté de préparation de milieux de culture à partir d'ingrédients pauvres en acide pantothénique retarda longtemps l'emploi des bactéries lactiques comme organismes d'essai (Gyorgi, 1949 ; Hyma, 1945 ; Strong *et al.*, 1941). *Lactobacillus casei* ATCC No 7469 (Neal et Strong, 1943) connut enfin la faveur des chercheurs mais, à cause de sa grande sensibilité aux lipides, on lui préféra *Lactobacillus arabinosus* 17-5 ATCC No 8014 (Hoag *et al.*, 1945 ; Skeggs et Wright, 1944). Dans nos travaux, nous suivrons donc avec quelques retouches, la méthode de Skeggs et Wright, standardisée par *The Association of Vitamin Chemists, Inc.*, (1951).

Lactobacillus arabinosus 17-5 ne répond qu'à l'action stimulante de l'acide pantothénique libre. Les formes conjuguées de la vitamine doivent donc subir une hydrolyse préalable. Aucune préparation de papaïne, de takadiastase, de mylase P ou de clarase n'accomplit parfaitement ce travail : l'essai avec le poulet le prouve (Willerton et Cromwell, 1942). L'hydrolyse acide ou alcaline s'avère aussi impraticable : la vitamine se scinde en β -alanine et en un acide dihydroxylique inactifs pour l'organisme d'essai (Snell *et al.*, 1939). Novelli *et al.* (1949) ont récemment démontré une libération pratiquement complète de la vitamine lorsque les formes conjuguées subissent une hydrolyse sous l'action de la phosphatase intestinale (Schmidt et Tannhauser, 1943) et d'une diastase du foie

(Novelli *et al.*, 1949). Les deux enzymes sont essentiels. Des essais préliminaires nous ont appris que la digestion du lait est nécessaire et que les formes conjuguées y représentent 16 à 28% de la vitamine totale.

Principe de la méthode

Cette méthode microbiologique repose sur le fait que l'acide pantothénique libre est indispensable à la croissance de *Lactobacillus arabinosus* 17-5. Le milieu d'essai doit donc contenir toutes les substances essentielles à cet organisme excepté l'acide pantothénique. La croissance de l'organisme est proportionnelle à la quantité d'acide pantothénique présente dans la solution standard et dans les solutions inconnues. On apprécie la croissance par turbidimétrie.

Réactifs

Solution-mère de pantothénate de calcium : 54.4 mg de pantothénate de calcium dans 500 ml d'éthanol à 50%. Cette solution est équivalente à une solution contenant 100 μ g d'acide pantothénique par ml. Elle doit être conservée au réfrigérateur sous toluène.

Solution standard de pantothénate de calcium : 4 ml de la solution-mère sont d'abord complétés à 100 ml avec de l'eau distillée, puis 1 ml de cette nouvelle solution est ajouté à 99 ml d'eau distillée. Cette solution contient 0.04 μ g d'acide pantothénique par ml. Elle doit être renouvelée chaque fois que la courbe standard est calibrée.

Solution isotonique : 9 g de NaCl dissous dans une quantité suffisante d'eau distillée pour former un litre. La solution est distribuée dans des tubes et des flacons par portions de 10 et 99 ml respectivement. Les tubes sont bouchonnés au coton et les flacons fermés par des bouchons vissés. La solution est stérilisée à 121 C pendant 20 minutes.

Tampon 0.12 M : 1.008 g de NaHCO_3 dans 100 ml d'eau distillée. pH final : 8.5. Une dilution 1:6 de ce tampon fournit un nouveau tampon 0.02 M pour le traitement de la diastase du foie. Il est nécessaire de remplacer ces solutions quotidiennement.

Solutions N NaOH et N/10 NaOH.

Indicateur à 0.02% de phénol rouge : 0.2 g de phénol rouge dans 600 ml d'éthanol complétés après dissolution à 1 litre avec de l'eau distillée. Cette solution vire au rouge à pH 8.4.

Phosphatase intestinale : 0.2 g de phosphatase intestinale en poudre acétonique (produit de Armour & Co., préparé selon Schmidt et Tannhauser, 1943) dans 10 ml d'eau distillée. C'est une solution à 2% assez stable, contenant 20 - 30 unités par ml, qui doit être conservée au réfrigérateur ; elle contient très peu d'acide pantothénique.

Coenzyme du foie : 1 g de "Pigeon Liver Acetone Powder" (produit de Armour & Co.) macéré à froid dans un mortier avec 10 ml de tampon 0.02 M et centrifugé 15 minutes à grande vitesse. Le liquide clair est décanté, gelé par portions de 1 ml et dégelé quelques minutes avant emploi. Cette préparation contient assez d'acide pantothénique pour fausser les résultats. Un témoin est donc nécessaire.

Milieux de culture

Des essais préliminaires nous ont démontré que les milieux déshydratés de Difco (Difco Laboratories Inc., Détroit, Michigan) fournissent des résultats satisfaisants. Ils se préparent en dissolvant la quantité prescrite de poudre dans de l'eau distillée. Nous les avons ensuite distribués en tubes par portions de 10 ml, excepté dans le cas du milieu d'essai qui fut ajouté par portions de 5 ml aux tubes de la solution standard et des solutions inconnues. La stérilisation se fit à 121 C pendant 12 à 15 minutes.

Milieu solide de conservation : 47 g de "Bacto-Micro Assay Culture Agar" dissous dans un litre d'eau distillée. Après stérilisation, les tubes sont refroidis en position verticale. Ce milieu contient au litre :

Bacto-Yeast Extract.....	20 g
Protéose-Peptide No 3, Difco.....	5 g
Bacto-Dextrose.....	10 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Bacto-Agar.....	10 g
pH final.....	6.7

Milieu liquide pour ensemencement : 37 g de "Bacto-Micro Inoculum Broth" dissous dans un litre d'eau distillée. Ce milieu est identique au précédent, mais ne contient pas d'agar.

Milieu d'essai : 75 g de "Bacto-Pantothenate Assay Medium" dans un litre d'eau distillée. Le milieu est distribué en tubes à essai par portions de 5 ml exactement. Pendant la mise en tube, la température doit demeurer constante ; on doit agiter pour maintenir le dépôt en suspension. Ce milieu contient au litre :

Bacto-Vitamin Free Casamino Acids.....	12 g
Bacto-Dextrose.....	40 g
Acétate de sodium.....	20 g
l-Cystine, Difco.....	0.2 g
dl-Tryptophane.....	0.2 g
Adénine.....	0.02 g
Guanine.....	0.02 g
Uracil.....	0.02 g
Hydrochlorure de thiamine.....	0.002 g
Riboflavine.....	0.002 g
Niacine.....	0.002 g

Hydrochlorure de pyridoxine.....	0.004 g
Acide p-amino-benzoïque, Difco.....	0.0002 g
Biotine.....	0.0000008 g
K ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	1 g
Sulfate de magnésium.....	0.4 g
Chlorure de sodium.....	0.02 g
Sulfate ferreux.....	0.02 g
Sulfate manganeux.....	0.02 g

Cette concentration est double de celle qui existera dans les tubes.

Cultures de Lactobacillus arabinosus 17-5 ATCC No 8014.

Culture de conservation. Chaque semaine, l'organisme d'essai est repiqué en profondeur dans 4 tubes de milieu solide, incubé 24 heures à 37 C, puis conservé au réfrigérateur.

Ensemencement. 24 heures avant l'inoculation des tubes, un tube de bouillon est inoculé à partir de la culture de conservation, incubé 24 heures à 37 C, centrifugé, décanté, suspendu dans 10 ml de solution isotonique, centrifugé de nouveau, décanté et resuspendu dans 10 ml de solution isotonique. 1 ml de cette suspension est prélevé et dilué dans un flacon contenant 99 ml de solution isotonique. La solution doit être légèrement trouble. Au moyen d'une seringue ou d'un compte-goutte, tous les tubes sont ensemencés avec une goutte de cette suspension.

Détermination de l'acide pantothénique

Préparation des tubes pour la calibration de la courbe standard : Dans 16 tubes-à-essai, 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 et 4.0 ml de la solution standard contenant 0.04 µg d'acide pantothénique par ml sont distribués en duplicata et le volume de chaque tube est complété à 5 ml avec de l'eau distillée.

Préparation des tubes de la solution inconnue : 2 échantillons de 9 ml sont prélevés de chacun des six flacons de culture bactérienne. Le premier échantillon sert à la détermination de l'acidité, qui s'effectue par addition à l'échantillon de 1 ml de phénol rouge à 0.02% et N/10 NaOH jusqu'à neutralisation. L'acidité s'exprime en ml de N/10 NaOH, ce qui est rapporté dans les Tableaux I-40 à I-51. Le deuxième échantillon est alors neutralisé avec N NaOH et complété à 10 ml avec de l'eau distillée. Après avoir bien mélangé, on prélève 1 ml de cette solution qui reçoit ensuite 0.2 ml de la solution à 2% de phosphatase intestinale, 0.05 ml de la solution 1:10 de "Pigeon Liver Acetone Powder", et 0.05 ml de la solution tampon NaHCO₃ 0.12 M, pour former un volume total de 1.30 ml.

Chaque fois qu'une digestion est ainsi préparée, elle doit s'accompagner d'un témoin dans lequel la solution bactérienne est remplacée par 1 ml d'eau

distillée. Ce témoin nous révèle que les diastases apportent à l'échantillon de 1 ml 0.6 à 1.2 μg d'acide pantothénique. Donc, une correction s'impose.

Les sept tubes sont alors incubés sous toluène à 37 C pendant 4 heures. Les six solutions inconnues sont diluées à 100 ml (dilution 9:1000) et le témoin à 25 ml (dilution 1:25) avec de l'eau distillée. Ces sept dilutions sont ensuite distribuées, en duplicata, dans des tubes-à-essai à raison de 0.5, 1.0, 2.0 et 3.0 ml par tube. Le volume de chaque tube est complété à 5 ml avec de l'eau distillée.

Tous les tubes reçoivent ensuite 5 ml du milieu d'essai et sont bouchonnés au coton. Ils sont stérilisés tous à la fois à 121 C pendant 12-15 minutes, déposés à la température de la chambre pendant plusieurs heures, afin que la température soit uniforme dans tous les tubes lors de l'inoculation,ensemencés avec une goutte d'inoculum et placés tous en même temps à l'incubateur à 37 C, incubés 18-24 heures, puis déposés au réfrigérateur pour arrêter la croissance.

Lecture. La croissance de *Lactobacillus arabinosus* s'apprécie par turbidimétrie. L'appareil, un spectrophotomètre Coleman Junior Model 6 A, est ajusté à 640 millimicrons. Tous les tubes-à-essai sont alors agités de façon que leur contenu soit bien homogène et libre de bulles d'air. Leur contenu est ensuite transféré dans des cuvettes spéciales dont le volume est de 20 ml environ. La cuvette témoin est introduite dans l'appareil qui est ajusté à 100% de transmittance. On fait ensuite la lecture des autres tubes contenant la solution standard et on trace une courbe sur papier semi-logarithmique ; elle est surtout précise entre 0.02 et 0.16 μg d'acide pantothénique. Le pourcentage de transmittance des tubes inconnus est finalement déterminé et les lectures comparées par interpolation à la courbe standard.

Calcul. Il faut d'abord faire la moyenne arithmétique (a) des duplicatas à chaque niveau ; cette moyenne est divisée, pour la solution enzymatique, par le nombre 4, afin de ramener sa dilution à 1:100 comme pour les autres solutions inconnues (b) ; (b) est soustrait de (a) à chaque niveau ; les résultats de chaque niveau sont ramenés à 1 ml en multipliant par 2, 1, 1/2 et 1/3 respectivement ; on multiplie ensuite par l'inverse de la dilution 9:1000 pour obtenir, à chaque niveau, le nombre de microgrammes d'acide pantothénique présent dans les cultures bactériennes ; enfin, la moyenne arithmétique des 4 niveaux donne le résultat final.

RÉSULTATS

Nous reproduisons, dans les Tableaux I-40 à I-51, la teneur en acide pantothénique de 36 souches microbiennes, à quatre périodes différentes d'incubation. Ces déterminations rendent compte de l'influence de chaque souche sur la teneur du lait en acide pantothénique après coagulation, laquelle correspond à peu près à la fin de la phase logarithmique de croissance, après 48 heures et après une semaine d'incubation. Les trois souches permettent de calculer une moyenne

TABLEAU I-40

*Influence de Thermobacterium yoghourtii
sur la teneur du lait en acide pantothénique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		µg D'ACIDE PANTOTHÉNIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
1	0	1.5	1.5	3.86	3.86		
	5	1.8	7.7	2.86	3.52	-1.00	0.66
	48	1.8	15.6	3.48	2.73	-0.38	-0.75
	168	2.6	24.0	3.58	3.62	-0.28	0.04
1c	0	2.0	2.0	3.61	3.61		
	5	2.0	7.8	2.36	3.54	-1.25	1.18
	48	2.5	14.5	3.96	2.43	0.35	-1.53
	168	3.9	23.1	3.04	3.33	-0.57	0.29
1d	0	2.0	2.0	3.61	3.61		
	5	2.0	5.8	3.73	3.73	0.12	0.00
	48	2.0	15.0	3.97	2.75	0.36	-1.22
	168	2.6	21.8	4.12	3.95	0.51	-0.17

TABLEAU I-41

*Influence de Thermobacterium bulgaricum
sur la teneur du lait en acide pantothénique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		µg D'ACIDE PANTOTHÉNIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
2b	0	1.5	1.5	2.94	2.94		
	5	1.6	6.9	2.69	2.18	-0.25	-0.51
	48	1.6	13.8	3.02	2.38	0.08	-0.64
	168	1.6	21.2	4.12	3.41	0.18	-0.71
2c	0	1.8	1.8	3.78	3.78		
	5	1.8	7.3	2.59	2.40	-1.19	-0.19
	48	1.8	17.5	2.83	2.66	-0.95	-0.17
	168	1.8	22.2	4.37	4.16	-0.59	-0.21
2d	0	1.6	1.6	3.82	3.82		
	5	1.7	6.1	2.48	2.26	-1.34	-0.22
	48	2.1	12.7	3.17	2.03	-0.65	-1.14
	168	2.1	20.8	2.92	4.19	-0.90	1.27

TABLEAU I-42

*Influence de Thermobacterium acidophilum
sur la teneur du lait en acide pantothénique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		μg D'ACIDE PANTOTHÉNIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
7	0	1.5	1.5	3.47	3.47		
	6	3.6	4.4	4.19	3.71	0.72	-0.48
	48	3.6	7.5	4.07	3.50	0.60	-0.57
	168	3.7	7.7	2.95	3.46	-0.52	0.51
7c	0	1.5	1.5	3.48	3.48		
	6	3.8	3.9	4.44	3.99	0.96	-0.45
	48	4.9	7.8	4.85	3.60	1.37	-1.25
	168	4.9	7.8	2.87	2.22	-0.61	-0.65
7d	0	1.5	1.5	3.64	3.64		
	6	3.7	4.5	4.69	4.46	1.05	-0.23
	48	4.5	7.9	4.96	3.86	1.32	-1.10
	168	4.5	7.9	2.94	2.49	-0.70	-0.45

TABLEAU I-43

*Influence de Streptococcus thermophilus
sur la teneur du lait en acide pantothénique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		μg D'ACIDE PANTOTHÉNIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
4	0	1.5	1.5	2.91	2.91		
	6	3.7	4.4	4.06	3.35	1.15	-0.71
	48	3.7	5.8	4.23	3.97	1.32	-0.26
	168	3.7	6.9	2.92	2.45	0.01	-0.47
4a	0	1.5	1.5	2.89	2.89		
	6	4.1	4.8	3.87	3.11	0.98	-0.76
	48	4.1	6.0	4.26	3.93	1.37	-0.33
	168	4.1	7.7	2.87	2.19	-0.02	-0.68
4b	0	1.5	1.5	3.35	3.35		
	6	4.1	4.5	3.94	3.56	0.59	-0.38
	48	4.1	6.1	4.65	3.71	1.30	-0.94
	168	4.1	7.8	2.94	2.49	-0.41	-0.45

TABLEAU I-44
Influence des bactéries du Yoghourt*
sur la teneur du lait en acide pantothénique

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		µg D'ACIDE PANTOTHÉNIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
3a	0	2.0	2.0	3.27	3.27		
	3	5.7	6.8	3.06	2.39	-0.21	-0.67
	48	5.7	10.0	3.08	2.64	-0.19	-0.44
	168	6.2	11.2	2.75	2.68	-0.52	-0.07
Da	0	2.0	2.0	3.06	3.06		
	3	3.1	4.4	3.31	2.41	0.25	-0.90
	48	4.5	6.5	3.00	2.64	-0.06	-0.36
	168	4.5	11.2	3.00	2.38	-0.06	-0.62
De	0	2.0	2.0	3.63	3.63		
	3	2.7	4.3	3.74	3.08	0.11	-0.66
	48	4.8	7.2	3.07	2.75	-0.56	-0.32
	168	4.8	9.0	2.84	3.21	-0.79	0.37

**Thermobacterium yoghourtii*, *Thermobacterium bulgaricum* et *Streptococcus thermophilus*.

TABLEAU I-45
Influence de *Streptococcus paracitrovorus*
sur la teneur du lait en acide pantothénique

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		µg D'ACIDE PANTOTHÉNIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
5a	0	1.2	1.2	3.34	3.34		
	24	1.6	5.1	3.59	3.28	0.25	-0.31
	48	2.0	7.0	4.04	2.45	0.70	-1.59
	168	2.2	9.2	4.03	3.34	0.69	-0.69
5b	0	1.4	1.4	3.18	3.18		
	24	1.7	7.5	3.51	2.92	0.33	-0.59
	48	2.0	8.4	3.83	2.90	0.65	-0.93
	168	2.4	9.5	3.48	3.30	0.30	-0.18
5d	0	1.4	1.4	3.10	3.10		
	24	1.8	7.4	3.13	2.76	0.03	-0.37
	48	2.2	8.5	5.57	3.67	2.47	-1.90
	168	2.6	9.0	3.63	3.54	0.53	-0.09

TABLEAU I-46

*Influence de Streptococcus cremoris
sur la teneur du lait en acide pantothénique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		μg D'ACIDE PANTOTHÉNIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
6b	0	1.6	1.6	3.43	3.43		
	24	1.9	7.0	3.72	3.24	0.29	-0.48
	48	3.0	8.2	4.38	4.56	0.95	0.18
	168	3.4	8.6	3.29	2.55	-0.14	-0.74
6c	0	1.7	1.7	3.53	3.53		
	24	2.1	3.7	4.61	3.70	1.08	-0.91
	48	2.5	5.8	4.06	4.24	0.53	0.18
	168	2.5	6.4	2.43	2.55	-1.10	0.12
6d	0	1.8	1.8	3.55	3.55		
	24	2.5	3.6	3.73	3.78	0.18	0.05
	48	2.5	5.6	4.73	4.44	1.18	-0.29
	168	2.6	6.8	2.56	2.63	-0.99	0.07

TABLEAU I-47

*Influence de Streptococcus lactis
sur la teneur du lait en acide pantothénique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		μg D'ACIDE PANTOTHÉNIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
10a	0	1.6	1.6	3.31	3.31		
	24	2.7	4.6	3.69	3.24	0.38	-0.45
	48	2.7	4.7	2.42	2.46	-0.89	0.04
	168	2.9	6.5	4.28	3.67	0.97	-0.61
10b	0	1.8	1.8	2.71	2.71		
	24	1.9	6.2	3.74	3.27	1.03	-0.47
	48	2.0	8.1	1.38	1.29	-1.33	-0.09
	168	2.8	9.6	4.35	3.71	1.64	-0.64
10c	0	1.8	1.8	2.82	2.82		
	24	2.0	7.0	4.69	3.44	1.87	-1.25
	48	2.0	8.0	1.70	1.07	-1.12	-0.63
	168	2.1	8.7	4.42	3.92	1.60	-0.50

TABLEAU I-48

*Influence de Streptococcus liquefaciens
sur la teneur du lait en acide pantothénique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		μg D'ACIDE PANTOTHÉNIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
16a	0	2.0	2.0	2.08	2.08		
	24	2.3	6.2	3.49	3.30	1.41	-0.19
	48	2.7	8.7	2.88	1.81	0.80	-1.07
	168	4.4	10.0	3.13	3.86	1.05	0.73
18	0	1.9	1.9	1.94	1.94		
	24	2.4	6.8	3.83	3.11	1.89	-0.72
	48	2.4	8.0	3.25	2.35	1.31	-0.90
	168	3.4	9.5	3.15	2.70	1.21	-0.45
18a	0	1.8	1.8	2.27	2.27		
	24	2.4	6.4	4.48	3.38	2.21	-1.10
	48	2.5	8.0	3.65	2.48	1.38	-1.17
	168	4.2	8.8	2.65	2.48	0.38	-0.17

TABLEAU I-49

*Influence de Propionibacterium shermanii
sur la teneur du lait en acide pantothénique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		μg D'ACIDE PANTOTHÉNIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
9a	0	1.5	1.5	3.28	3.28		
	24	2.5	5.7	3.72	3.26	0.44	-0.46
	48	2.5	10.0	4.49	3.03	1.21	-1.46
	168	2.6	10.5	3.07	2.72	-0.21	-0.35
9d	0	1.5	1.5	3.38	3.38		
	24	2.8	3.8	3.92	3.06	0.54	-0.86
	48	2.8	6.5	2.25	1.81	-1.13	-0.44
	168	3.4	11.5	2.71	1.70	-0.67	-1.01
9g	0	1.7	1.7	3.05	3.05		
	24	2.6	3.4	3.76	3.22	0.71	-0.54
	48	2.6	6.7	3.03	2.31	-0.02	-0.72
	168	2.7	10.2	2.84	2.43	-0.21	-0.41

TABLEAU I-50
Influence de *Lactobacillus casei*
sur la teneur du lait en acide pantothénique

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		μg D'ACIDE PANTOTHÉNIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
8	0	2.2	2.2	2.95	2.95		
	24	2.5	4.7	3.37	3.47	0.42	0.10
	48	3.0	6.6	3.13	2.37	0.18	-0.76
	168	7.6	12.8	3.21	2.09	0.26	-1.12
8a	0	2.2	2.2	2.78	2.78		
	24	2.9	5.6	2.97	2.74	0.19	-0.23
	48	3.5	7.5	2.70	2.20	-0.08	-0.50
	168	8.0	13.1	1.91	2.08	-0.87	0.17
8b	0	2.2	2.2	2.72	2.72		
	24	2.3	5.2	2.77	2.34	0.05	-0.43
	48	2.4	7.6	4.16	2.36	1.44	-1.80
	168	6.1	13.1	3.04	2.28	0.32	-0.76

TABLEAU I-51
Influence des microorganismes du Kéfir*
sur la teneur du lait en acide pantothénique

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		μg D'ACIDE PANTOTHÉNIQUE PAR ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
O	0	--	1.9	--	3.25		
	24	--	3.2	--	2.78	--	-0.47
	48	--	11.7	--	2.69	--	-0.56
	168	--	15.8	--	6.30	--	3.05
A	0	--	1.9	--	2.55		
	24	--	4.7	--	2.77	--	0.22
	48	--	11.1	--	3.65	--	1.10
	168	--	18.6	--	10.63	--	8.08
NB	0	--	1.9	--	3.18		
	24	--	5.3	--	2.39	--	-0.79
	48	--	13.1	--	3.75	--	0.57
	168	--	19.2	--	11.25	--	8.07

**Lactobacillus caucasicus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus kefir*, *Saccharomyces fragilis* et *Torula kefir*.

dont nous avons tracé la résultante dans les figures I-13 à I-16. Ces figures représentent le portrait, sans retouche, des quatre groupes de bactéries lactiques : les thermophiles, les mésophiles A, les mésophiles B et le kéfir ; leur température optimum de croissance se situe à 41 C, 37 C, 22 C et 22 C respectivement.

Des essais préliminaires nous révélèrent que la teneur du lait s'établissait, à cette période de l'année, à environ 4 μg par ml. Ces déterminations correspondent bien à celles de Stefaniak et Peterson (1946) et de Pearson et Dornell (1946). La préparation des témoins s'avéra nécessaire, car cette teneur s'abaisse avec le temps.

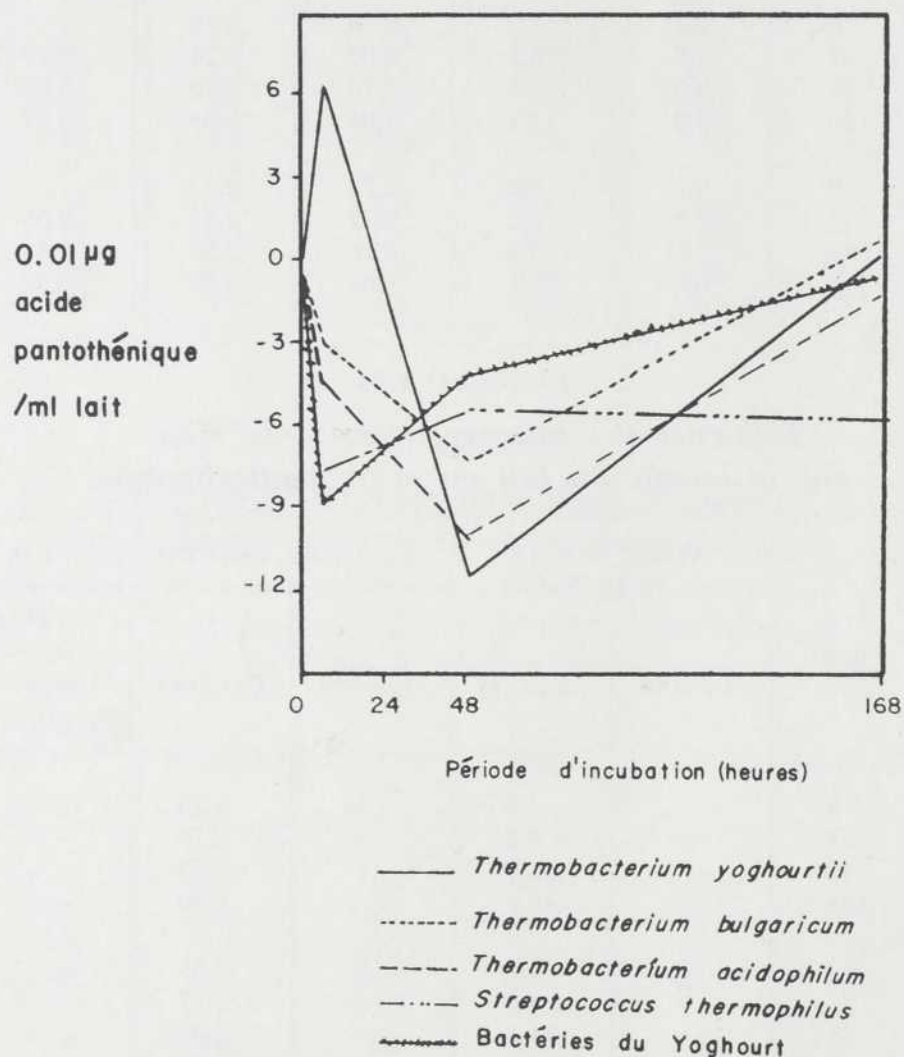


Figure I-13. Augmentation ou diminution de la teneur originale du lait (O) en acide pantothénique. Influence des bactéries lactiques thermophiles.

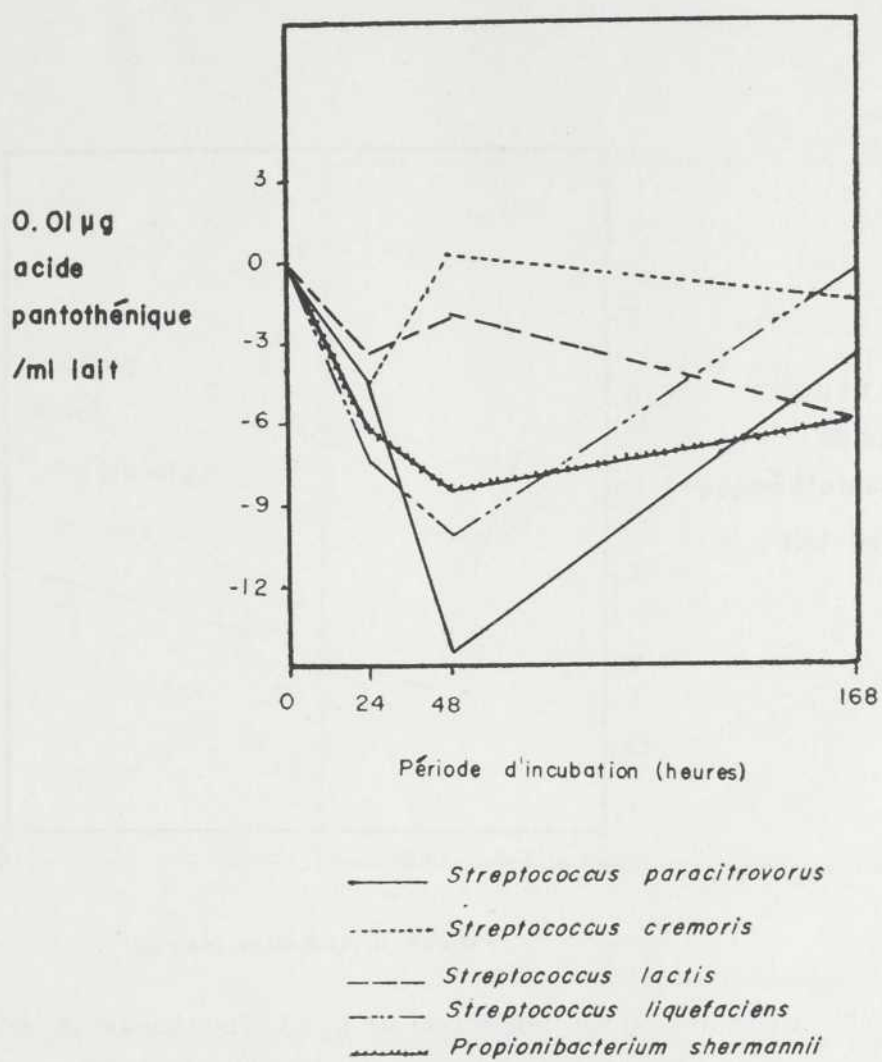


Figure I-14. Augmentation ou diminution de la teneur originale du lait (O) en acide pantothénique. Influence des bactéries lactiques mésophiles A.

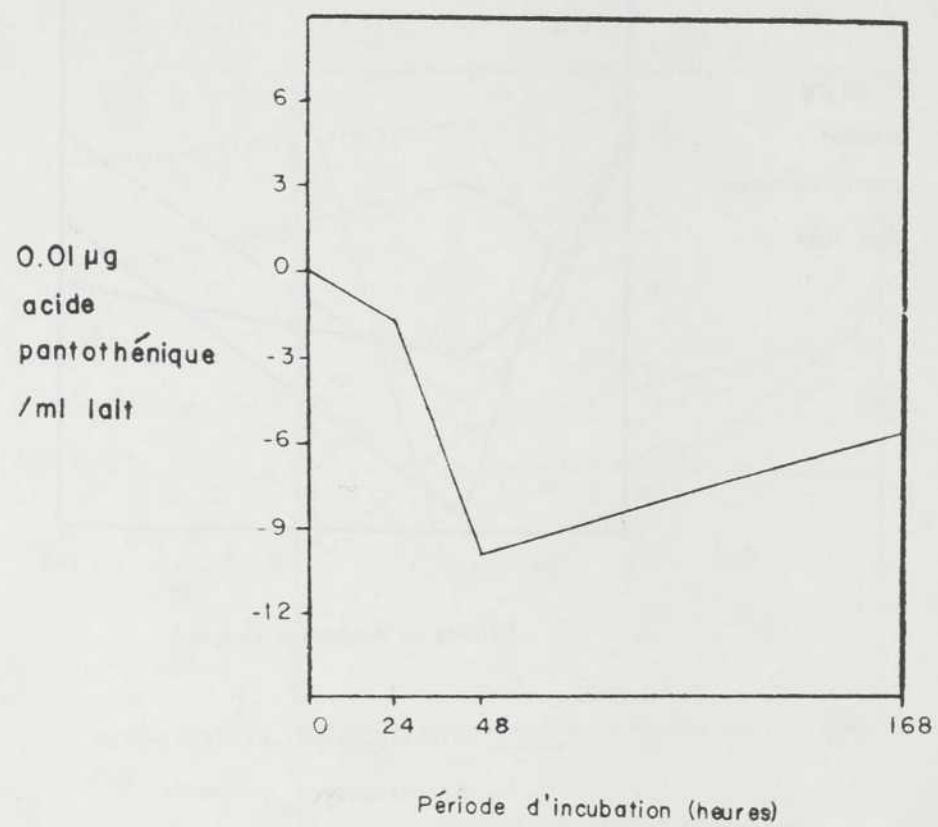


Figure I-15. Augmentation ou diminution de la teneur originale du lait (O) en acide pantothénique. Influence des bactéries lactiques mésophiles B.

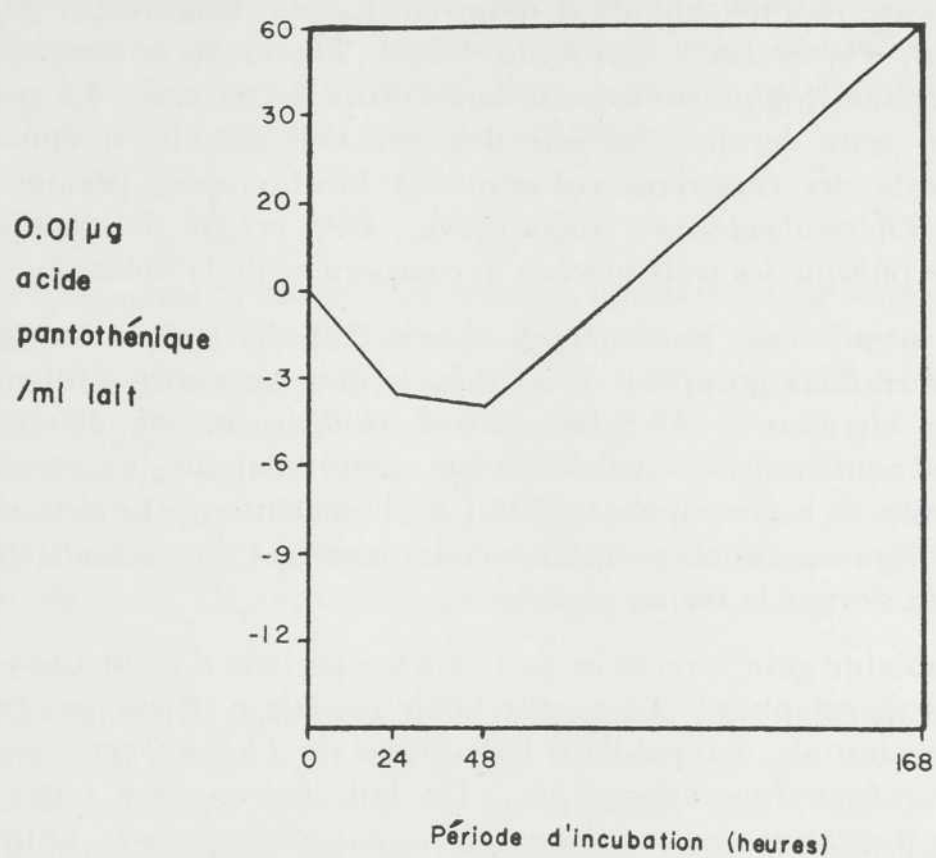


Figure I-16. Augmentation ou diminution de la teneur originale du lait (O) en acide pantothénique. Influence des microorganismes du kéfir.

DISCUSSION

Les quatre figures précédentes nous ont permis de grouper les bactéries lactiques selon leurs caractères cultureux. Dans l'étude de leurs exigences, il convient de respecter ces distinctions.

Bactéries thermophiles -

Toutes les bactéries thermophiles, excepté *Thermobacterium yoghourtii*, consomment de l'acide pantothénique durant leur phase logarithmique de croissance qui se termine après une période d'incubation de 3 à 6 heures à 41 C. Les bactéries du yoghourt se montrent les plus exigeantes : *Streptococcus thermophilus*, *Thermobacterium acidophilum*, *Thermobacterium bulgaricum* et *Thermobacterium yoghourtii* suivent dans l'ordre décroissant. La synthèse de la vitamine par cette dernière bactérie demeure inexplicable, si l'on se rappelle qu'elle possède des caractères cultureux et biochimiques presque identiques à ceux de *Thermobacterium bulgaricum*. Une erreur de manipulation est inadmissible puisque les trois souches se comportent de la même façon.

Après coagulation, les bactéries continuent de croître lentement et se différencient en deux groupes : *Thermobacterium yoghourtii* utilise une grande quantité de vitamine ; *Thermobacterium bulgaricum* et *Thermobacterium acidophilum* consomment aussi de l'acide pantothénique durant cette période qui se termine 48 heures après le début de l'incubation. Le deuxième groupe comprend *Streptococcus thermophilus* et les bactéries du yoghourt qui accusent un léger gain durant la même période.

Un semblable gain caractérise la troisième période d'incubation chez toutes les bactéries thermophiles. La teneur finale du lait n'atteint pas cependant la concentration initiale, excepté dans les cultures de *Thermobacterium yoghourtii* et de *Thermobacterium bulgaricum*. Un fait intéressant à noter est le rôle tampon que joue *Streptococcus thermophilus* dans le yoghourt. Cette bactérie et celles du yoghourt suivent une voie parallèle du début à la fin de l'incubation.

Bactéries mésophiles A -

La consommation de vitamine par les bactéries mésophiles A est parallèle durant toute la phase logarithmique de croissance qui se termine après une incubation d'environ 24 heures.

Durant la seconde période, une bifurcation se produit : *Streptococcus paracitrovorus* accentue sa consommation de vitamine et s'avère à la fin de la période la plus exigeante de toutes les bactéries à l'étude ; *Streptococcus liquefaciens* et *Propionibacterium shermanii* l'imitent, mais leur consommation est moins grande. Le deuxième groupe connaît une faible synthèse avec *Streptococcus*

cremoris et *Streptococcus lactis*. Le comportement opposé de *Streptococcus paracitrovorus* et de *Streptococcus cremoris* semble encore ici une anomalie.

Une synthèse par les bactéries exigeantes de la deuxième période caractérise la dernière phase d'incubation. *Streptococcus cremoris* et *Streptococcus lactis* se maintiennent durant cette période. La teneur des cultures en acide pantothénique s'établit, après une semaine, à un niveau un peu inférieur à celui de la concentration initiale ; on observait le même résultat chez les thermophiles.

Bactéries mésophiles B -

Lactobacillus casei est le seul représentant de ce groupe. Il consomme peu d'acide pantothénique durant sa phase logarithmique de croissance, mais ses exigences s'accroissent durant la deuxième période d'incubation. Durant la dernière phase, il réalise quelque synthèse, mais la teneur en vitamine demeure, après une semaine, bien inférieure à la teneur initiale.

Bactéries et levures du kéfir -

Durant les premières 24 heures d'incubation, les bactéries du kéfir connaissent un développement rapide, élèvent l'acidité du milieu et consomment de l'acide pantothénique. La courbe se redresse un peu durant la période suivante. Une fois l'acidité développée, le milieu devient favorable aux levures qui synthétisent en des proportions qui défient toutes les bactéries. La teneur finale du kéfir s'établit, selon les souches, à un niveau 2 à 4 fois plus élevé que la teneur initiale. On n'a pas déterminé si ces levures synthétisent la vitamine de toute pièce ou à partir de la β -alanine, de l'acide dihydroxylique ou des deux précurseurs à la fois.

Les douze Tableaux précédents ne nous révèlent aucun parallélisme entre l'acidité et la teneur vitaminique. Il semble, cependant, que l'acidité favorise indirectement la synthèse. En effet, les bactéries ont besoin d'acide pantothénique pour utiliser le lactose du lait. L'acidité se développe en même temps jusqu'à inhiber la croissance. Les besoins en vitamine deviennent alors moins grands. La synthèse que l'on observe durant la dernière phase d'incubation semble la manifestation d'une fonction de protection.

CONCLUSION

La biosynthèse de l'acide pantothénique est un fait indéniable. Toutes les classes de microorganismes comptent des représentants qui savent accomplir la synthèse totale ou partielle de la vitamine. L'intestin des animaux héberge aussi des synthétiseurs importants qui satisfont jusqu'à 50% des exigences de leurs hôtes. La difficulté de reproduire *in vitro* le milieu intestinal compromet encore l'isolement de ces organismes.

La structure anatomique des animaux prime tous les facteurs qui régissent l'établissement de la flore idéale. Les polygastriques hébergent les microorganismes dans leur rumen : les protozoaires et les bactéries reçoivent donc un approvisionnement calorique abondant et la vitamine synthétisée s'assimile tout le long du tube digestif. Les monogastriques ne connaissent pas les mêmes privilèges : leur flore synthétisante se retranche dans le caecum et se contente souvent d'une pauvre source d'énergie. L'alimentation doit alors intervenir en fournissant des aliments qui descendent l'appareil digestif sans avarie ; les glucides complexes sont les meilleurs puisqu'ils échappent à l'absorption intestinale et deviennent la proie facile des microbes du caecum et de l'intestin. La vitamine synthétisée est en grande partie perdue cependant, car la surface d'absorption est réduite ; cette perte en acide pantothénique est surtout grave chez l'homme.

Ces connaissances élémentaires doivent guider le diététicien. Les polygastriques sont indépendants de toute source extérieure d'acide pantothénique. Les monogastriques sont jugés sur la feuille d'alimentation comme des organismes dépendants. Tant qu'on sera impuissant à leur assurer des conditions intestinales avantageuses, on n'attachera pas trop d'importance à la synthèse intestinale, et l'on interrogera plutôt le contenu alimentaire.

Cette étude historique nous a amené à déterminer l'influence de 12 espèces de bactéries lactiques sur la teneur du lait en acide pantothénique ; nous résumons nos résultats en cinq points :

1. D'une façon générale, toutes les bactéries lactiques utilisent l'acide pantothénique du lait pour amorcer leur croissance et satisfaire aux besoins de leur mécanisme glucidique durant la phase logarithmique de leur croissance. La synthèse par *Thermobacterium yoghourtii* demeure sans explication.

2. Durant la deuxième période d'incubation, la teneur du lait, à quelques exceptions près, se maintient en plateau. Les exceptions réfèrent à *Thermobacterium yoghourtii* et *Streptococcus paracitrovorus* qui consomment considérablement. Quelques autres bactéries synthétisent, mais d'une façon négligeable.

3. La dernière période d'incubation se caractérise par une synthèse générale qui n'a pas de signification et semble la manifestation d'une fonction protectrice.

4. On ne peut saisir aucune corrélation entre l'acidité et la concentration vitaminique ; il semble cependant que l'acidité favorise indirectement la synthèse vitaminique : on a déjà discuté cette hypothèse.

5. Nos essais préliminaires justifient la digestion du lait par la phosphatase intestinale et une coenzyme du foie. Les formes conjuguées y représentent 16 à 28% de l'acide pantothénique total.

BIBLIOGRAPHIE

- ACKERMANN, W. W., et SHIVE, W. 1948 α -amino- β , β -dimethyl- γ -hydroxybutyric acid: a precursor of pantoic acid. *J. Biol. Chem.*, **175**, 867.
- ASSOCIATION OF VITAMIN CHEMISTS, Inc. 1951 *Methods of Vitamin Assay*. Interscience Publ., Inc. New York.
- ATKIN, L., WILLIAMS, W. L., SCHULTZ, A. S., et FREY, C. N. 1944 Yeast microbiological methods for determination of vitamins. Pantothenic acid. *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **16**, 67.
- BEADLE, G. W., et TATUM, E. L. 1949 Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S.*, **27**, 499.
- BERKMAN, S. 1942 Accessory growth factor requirements of the members of the genus *Pasteurella*. *J. Infectious Diseases*, **71**, 201.
- BROWN, G. M., CRAIG, J. A., et SNELL, E. E. 1950 Relation of the LBF to pantothenic acid and coenzyme A. *Arch. Biochem.*, **27**, 473-475.
- BURKHOLDER, P. R. 1943 *Am. J. Botany*, **30**, 206.
- BURKHOLDER, P. R., et McVEIGH, I. 1939 Synthesis of vitamins by intestinal bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S.*, **28**, 285.
- CARROLL, F. D., GOSS, H., et HOWELL, C. E. 1949 The synthesis of B vitamins in the horse. *J. Animal Sci.*, **8**, 292-299.
- COOPER, E. A. 1914 On the protective and curative properties of certain foodstuffs against polyneuritis indicated in birds by diet of polished rice. *J. Hyg.*, **14**, 12.
- CRAIG, J. A., et SNELL, E. E. 1951 The comparative activities of pantothenine, pantothenic acid and coenzyme A on various microorganisms. *J. Bacteriol.*, **61**, 283-293.
- DANN, W. J. 1941 *J. Biol. Chem.*, **141**, 803.
- DENKO, C. W., GRUNDY, W. A., PORTER, J. W., BERRYMAN, G. H., FRIEDMANN, T. E., et YOUMANS, J. B. 1946 *Arch. Biochem.*, **10**, 33.
- EL-SADR, M. M., HOND, H. G., MACRAE, T. F., WORK, C. E., LYTHGOE, B., et TODD, A. R. 1939 Vitamin B requirements of the rat. *Nature*, **144**, 73.
- EVANS, W., HANDLEY, W. R., et HAPPOLD, F. C. 1939 The nutrition of *Corynebacterium diphtheriae*. Pantothenic acid as an essential growth factor on certain strains of *C. diphtheriae gravis*; the synthesis of some physiologically active compounds by *C. diphtheriae* cultures of synthetic media. *Brit. J. Exptl Pathol.*, **20**, 396-408.
- FOSTER, L. W. 1949 *Chemical Activities of Fungi*. Academic Press, New York.
- GALL, L. S., ILLINGWORTH, B. S., CAWHILL, G. R., et FENTON, P. F. 1948 The nutrition of the mouse. III. Relation of diet to the synthetic activity of the predominating flora isolated from the small intestine and caecum. *J. Nutrition*, **35**, 27.
- GARNJOBST, L., TATUM, E. L., et TAYLOR, C. V. 1943 *J. Cellular Comp. Physiol.*, **21**, 199-212.
- GYORGI, P. 1949 *Vitamin Methods*. 2 vols. Academic Press, Inc. New York.
- HARTELLUS, V., et JOHANSEN, G. 1946 The influence of α , β -dihydroxy - β -dimethylbutyric acid on yeast growth. *Compt. rend. tra. lab. Carlsberg, Sér. Physiol.*, **24**, 133-141.
- HASSINEN, J. B., BURBIN, G. T., TOMARELLI, R. M., et BERNHART, F. W. 1951 The minimal nutritional requirements of *Lactobacillus bifidus*. *J. Bacteriol.*, **62**, 771-777.
- HEGSTED, D. M. 1948 Activity of pantothenol as pantothenic acid in promoting chick growth. *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **69**, 571.

- HEGSTED, D. M., et LIPMAN, F., 1948 The pantothenic acid content of coenzyme A by chick assay. *J. Biol. Chem.*, **174**, 89.
- HOAG, E. H., SARRETT, H. P., et CHELDELIN, V. H. 1945 Use of *Lactobacillus arabinosus* 17-5 for microassay of pantothenic acid. *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **17**, 60.
- HUGHES, E. H., et ITTNER, N. R. 1942 The minimum requirement of pantothenic acid for the growing pig. *J. Animal Sci.*, **1**, 85.
- HYMA, A. M. 1945 A synthetic medium on microbiological assay of riboflavin, pantothenic acid, biotin, nicotinic acid, pyridoxine and folic acid. Thesis. Michigan State College.
- JUKES, T. H. 1939 The pantothenic acid requirement of the chick. *J. Biol. Chem.*, **129**, 225.
- JUKES, T. H. 1941 The distribution of pantothenic acid in certain products of natural origin. *J. Nutrition*, **21**, 193.
- KING, T. E., et CHELDELIN, V. H. 1948 Pantothenic acid studies. IV. Propionic acid and β -alanine utilization. *J. Biol. Chem.*, **174**, 273-281.
- KING, T. E., FELS, I. G., et CHELDELIN, V. H. 1949 Pantothenic acid studies. VI. A biologically active conjugate of pantothenic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 131.
- KING, T. E., STRONG, F. M., et CHELDELIN, V. H. 1950 Pantothenic acid studies. X. The influence of a pantothenic acid conjugate (PAC) upon growth and citrate formation in rats. *J. Nutrition*, **42**, 195-207.
- KITAY, Estelle, et SNELL, E. E. 1950 Some additional nutritional requirements of certain lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.*, **60**, 49.
- KNIGHT, B. C. J. G. 1945 Growth factors in microbiology. Some wider aspects of nutritional studies with microorganisms. Dans *Vitamins and Hormones*, **3**, Academic Press. New York.
- KOSER, S. A., BRESLOVE, B. B., et DORFMAN, A. 1941 Accessory growth factor requirements of some representatives of the *Brucella* group. *J. Bacteriol.*, **41**, 37.
- KOSER, S. A., et WRIGHT, M. H. 1943 Vitamin requirements of *Torula cremoris*. *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **53**, 249.
- KRATZER, F. H., et WILLIAMS, D. 1948 The pantothenic acid requirements of poult for early growth. *Poultry Sci.*, **27**, 518.
- KRUEGER, K. K., et PETERSON, W. H. 1948 The nutritional requirements of *Lactobacillus pentosus* 124-2. *J. Bacteriol.*, **55**, 683.
- KUPFERBERG, A. B., JOHNSON, J. G., et SPRINCE, H. 1948 *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **67**, 304.
- LAMANNA, C., et LEWIS, C. 1946 An observation of apparent substitution of pantothenate by thiamine and choline. *J. Bacteriol.*, **51**, 398-399.
- LARDINOIS, C. C., MILES, R. C., ELVEHJEM, C. A., et HART, E. B. 1944 Rumen synthesis of the vitamin B complex as influenced by ration composition. *J. Dairy Sci.*, **27**, 579-583.
- LOCKHEAD, A. G., et LANDERKIN, G. B. 1942 Nutrilite requirement of osmophilic yeasts. *J. Bacteriol.*, **44**, 343-351.
- LWOFF, A. 1951 *Biochemistry and Physiology of Protozoa*. Academic Press, Inc. New York.
- LWOFF, A., et DUSI, H. 1938 Cultures de divers flagellés leucophytes en milieu synthétique. *Compt. rend. soc. biol.*, **127**, 53.
- METCHNIKOFF, E. 1901 Sur la flore du corps humain. *Mem. Proc. Manchester Lit. & Phil. Soc.*, **45**, 1-38.
- METZGER, H. I. 1947 Microbic decomposition of pantothenic acid. *J. Bacteriol.*, **54**, 135-148.
- MITCHELL, H. K., et ISBELL, E. R. 1942 Intestinal bacterial synthesis as a source of B vitamin for the rat. *Univ. Texas Publ. No. 4237*, 125-134.

- MUELLER, J. H., et KLOTZ, H. W. 1938 Pantothenic acid as a growth factor for the diphtheria bacillus. *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 3086-3087.
- McBURNIEY, C. H., BOLLEN, W. B., et WILLIAMS, R. J. 1935 Pantothenic acid and the nodule bacteria-legume symbiosis. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S.*, **21**, 301-304.
- McELROY, L. W., et GOSS, H. 1939 Report on four members of the vitamin B complex synthesized in the rumen of the sheep. *J. Biol. Chem.*, **130**, 437-438.
- McELROY, L. W., et GOSS, H. 1941 A quantitative study of vitamins in the rumen contents of sheep and cows fed vitamin-low supplements. IV. Pantothenic acid. *J. Nutrition*, **21**, 405-409.
- McILWAIN, H. 1943 Nutritional studies of bacterial variations. I. Resistance to pantooyl-aurine in naturally occurring and experimentally prepared strains. *Brit. J. Exptl Pathol.*, **24**, 203-212.
- McRORIE, R. A., SHERWOOD, F. W., et WILLIAMS, W. L. 1950 Replacement of pantothenic acid by the *Lactobacillus bulgaricus* factor in rat nutrition. *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **75**, 392.
- McRORIE, R. A., et WILLIAMS, W. L. 1951 Studies on the relationship between the *Lactobacillus bulgaricus* factor and pantothenic acid. *J. Bacteriol.*, **61**, 737-745.
- NEAL, A. L., et STRONG, F. M. 1943 Microbiological determination of pantothenic acid. *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **15**, 654.
- NIELSEN, N., et HARTELIUS, V. 1945 *Compt. rend. tra. lab. Carlsberg, Sér. Physiol.*, **24**, 117.
- NISHI, H., KING, T. E. K., et CHELDELIN, V. H. 1950 Pantothenic acid studies. IX. The influence of dietary pantothenic acid upon a pantothenic acid conjugate (PAC) in rat tissues. *J. Nutrition*, **41**, 279-291.
- NORRIS, R. F., FLANDERS, R. M., TOMARELLI, R. M., et GYORGI, P. 1950 The isolation and cultivation of *Lactobacillus bifidus*; a comparison of branched and unbranched strains. *J. Bacteriol.*, **60**, 681-696.
- NOVELLI, G. D., KAPLAN, N. O., et LIPMAN, F. 1949 The liberation of pantothenic acid from coenzyme A. *J. Biol. Chem.*, **177**, 97-107.
- NUTTALL, G. D. E., et THIERFELDER, H. 1895 Thierisches Leben ohne Bakterien im Verfaulungsanal. *Z. physiol. Chem.*, **21**, 109-121.
- OLESON, J. J., WOOLLEY, D. W., et ELVEHJEM, C. A. 1939 Is pantothenic acid essential for the growth of rats? *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **42**, 151.
- PASTEUR, L. 1885 Observations relatives à la note précédente de M. Duclaux. *Compt. rend.*, **68**, 100.
- PEARSON, P. B., et DORNELL, A. L. 1946 The thiamin, riboflavin, nicotinic acid and pantothenic acid content of colostrum and milk of the cow and ewe. *J. Nutrition*, **31**, 51-52.
- PEARSON, P. B., et SCHMIDT, H. 1948 Pantothenic acid studies with the horse. *J. Animal Sci.*, **7**, 78-83.
- PELCZAR, M. J., et PORTER, J. R. 1941 *J. Biol. Chem.*, **139**, 111.
- PETERSON, W. H., et PETERSON, Mary S. 1945 Relation of bacteria to vitamins and other growth factors. *Bacteriol. Revs*, **9**, 49.
- PFALTZ, J. M. 1944 Vitaminforschungen. *Chemical Abstracts*, **38**, 6339.
- PORTER, J. R. 1948 *Bacterial Chemistry and Physiology*. John Wiley, New York.
- RANE, L., et SUBBAROW, Y. 1940 *J. Biol. Chem.*, **134**, 455.
- RASMUSSEN, R. A., SMILEY, K. L., ANDERSON, J. G., VAN LANEN, J. M., WILLIAMS, W. L., et SNELL, E. E. 1950 Microbial synthesis and multiple nature of *Lactobacillus bulgaricus* factor: possible role in chick nutrition. *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **73**, 658-660.

- REYNIERS, J. A. 1946 Germ-free life applied to nutrition studies. Lobund Report No. 1, 87-120.
- ROBINSON, F. A. 1951 *The Vitamin B Complex*. John Wiley. New York.
- ROSENBERG, H. R. 1945 *Chemistry and Physiology of the Vitamins*. Interscience Publ., Inc. New York.
- RUBIN, S. H., COOPERMAN, J. M., MOORE, M. E., et SCHEINER, J. 1948 Physiological availability of pantothenyl alcohol. *J. Nutrition*, **35**, 499.
- RYAN, F. J., BALLENTINE, R., STOLAVY, E., CARSON, M. E., et SCHNEIDER, L. K. 1945 The biosynthesis of pantothenic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 1857-1858.
- RYAN, F. J., SCHNEIDER, L. K., et BALLENTINE, R. 1947 The growth of *Clostridium septicum* and its inhibition. *J. Bacteriol.*, **53**, 417.
- SANDZA, J. G., et LEPPOLD, C. 1941 Requirement of the mouse for pantothenic acid and for a new factor of the vitamin B complex. *J. Nutrition*, **21**, 609.
- SARETT, H. P., et CHELDELIN, V. H. 1945a The utilization of β -alanine and pantothenic acid by yeasts. *J. Bacteriol.*, **49**, 31.
- SARETT, H. P., et CHELDELIN, V. H. 1945b The use of *Acetobacter suboxydans* for assay of the lactone moiety of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.*, **159**, 311.
- SCHMIDT, C., et TANNHAUSER, S. J. 1943 *J. Biol. Chem.*, **149**, 369.
- SCHULTZ, A. S., et ATKIN, L. 1947 *Arch. Biochem.*, **14**, 369.
- SHAEFER, A. E., McKIBBIN, J. M., et ELVEHJEM, C. A. 1942 Pantothenic acid deficiency studies in dogs. *J. Biol. Chem.*, **143**, 321.
- SKEGGS, H. R., et WRIGHT, L. D. 1944 The use of *Lactobacillus arabinosus* 17-5 in the microbiological determination of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.*, **156**, 21.
- SNELL, E. E. 1946 Growth factors for microorganisms. *Ann. Rev. Biochem.*, **15**, 375-396.
- SNELL, E. E., PENNINGTON, E., et WILLIAMS, R. J. 1940 The effect of diet on the pantothenic acid content of chick tissues. *J. Biol. Chem.*, **133**, 559.
- SNELL, E. E., STRONG, F. M., et PETERSON, W. H. 1938 Pantothenic and nicotinic acids as growth factors for lactic acid bacteria. *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 2825.
- SNELL, E. E., STRONG, F. M., et PETERSON, W. H. 1939 Growth factors for bacteria. VIII. Pantothenic and nicotinic acids as essential growth factors for lactic and propionic acid bacteria. *J. Bacteriol.*, **38**, 293.
- SPIES, T., STANBERRY, S. R., WILLIAMS, R. J., JUKES, T. H., et BABCOCK, S. H. 1940 Pantothenic acid in human nutrition. *J. Am. Med. Assoc.*, **115**, 523.
- SQUALKOWSKI, C. R., MADER, W. J., et FREDIANI, H. A. 1950 *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **22**, 369.
- STEFANIAK, J. J., et PETERSON, W. H. 1946 Pantothenic acid, niacin and biotin content of commercial and experimental milks. *J. Dairy Sci.*, **29**, 783-788.
- STRONG, F. M., FEENEY, R. E., et EARLE, A. 1941 Microbiological assay for pantothenic acid. *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **13**, 566.
- SUBBAROW, Y., et RANE, L. 1939 Pantothenic acid as a growth factor for the Dochez NYS strain of hemolytic streptococcus. *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 1615.
- SUBBAROW, Y., et TRACER, W. 1943 *J. Exptl Med.*, **77**, 411.
- TANNER, F. W., PFEIFFER, S. E., et VAN LANEN, J. M. 1945 *Arch. Biochem.*, **8**, 29.
- THOMPSON, R. C. 1942 Synthesis of B vitamins by bacteria in pure culture. *Univ. Texas Publ.*, No. 7, 3-4.
- UNDERKOFFER, L. A., BANTZ, A. C., et PETERSON, W. H. 1943 Growth factors for bacteria. XIV. Growth requirements of *Acetobacter suboxydans*. *J. Bacteriol.*, **45**, 183.

- UNNA, K. 1940 Pantothenic acid requirement of the rat. *J. Nutrition*, **20**, 565.
- WAGNER, R. W., et GUIRARD, B. M. 1948 *Proc. Natl Acad. Sci. U. S.*, **34**, 398.
- WEGNER, M. I., BOOTH, A. N., ELVEHJEM, C. A., et HART, E. B. 1941 Rumen synthesis of the vitamin B complex on natural rations. *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **47**, 90-94.
- WEINSTOCK, H. H., MITCHELL, H. K., PRATT, E. F., et WILLIAMS, R. J. 1939 Pantothenic acid. IV. Formation of β -alanine by cleavage. *J. Am. Chem. Soc.*, **61**, 1421.
- WEST, P. M., et WILSON, P. W. 1940 Biotin as a growth stimulant for the root nodule bacteria. *Enzymologia*, **8**, 152-162.
- WILLERTON, E., et CROMWELL, H. W. 1942 Microbiological assay of natural pantothenic acid in yeasts. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **14**, 603.
- WILLIAMS, R. J. 1941 *Biol. Revs.*, **16**, 49.
- WILLIAMS, R. J., EAKIN, R. E., BURSTECKER, E., Jr., et SHIVE, W. 1950 *The Biochemistry of B Vitamins*. American Chemical Society Monograph 110. Reinhold Publ., Corp. New York.
- WILLIAMS, R. J., EAKIN, R. E., et SNELL, E. E. 1940 The relationship of inositol, thiamin, biotin, pantothenic acid and vitamin B₆ to the growth of yeasts. *J. Am. Chem. Soc.*, **62**, 1204-1207.
- WILLIAMS, R. J., HOFF-JØRGENSEN, E., et SNELL, E. E. 1949 Determination and properties of an unidentified growth factor for *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Biol. Chem.*, **177**, 933-940.
- WILLIAMS, R. J., LYMAN, C. M., GOODYEAR, G. H., TRUESDAIL, J. H., et HOLADAY, D. 1933 Pantothenic acid, a growth determination of universal biological occurrence. *J. Am. Chem. Soc.*, **55**, 2912-2927.
- WILLIAMS, R. J., MOSHER, W. A., et ROHRMAN, M. 1936 The importance of pantothenic acid in fermentation, respiration and glycogen storage. *Biochem. J. (London)*, **30**, 2036.
- WILLIAMS, R. J., et TRUESDAIL, J. H. 1931 *J. Am. Chem. Soc.*, **53**, 4171.
- WILLIAMS, R. J., TRUESDAIL, J. H., WEINSTOCK, H. H., Jr., ROHRMAN, E., LYMAN, C. M., et MCBURNEY, C. H. 1938 Pantothenic acid. II. Its concentration and purification from liver. *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 2719.
- WILSON, G. S., et MILES, A. A. 1948 *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*. Arnold. London.
- WOLLISH, E. G., et SCHMALL, M. 1950 *Anal. Chem.*, **22**, 1033.
- WOOLLEY, D. W. 1939 Biological responses to the constituent parts of pantothenic acid. *J. Biol. Chem.*, **130**, 417.
- WOOLLEY, D. W. 1941 Relationship of pantothenic acid and inositol to alopecia in mice. *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, **46**, 565.
- WOOLLEY, D. W. 1942 *J. Exptl Med.*, **75**, 277.
- WOOLLEY, D. W., et HUTCHINGS, B. L. 1939 Some growth factors for hemolytic streptococci. *J. Bacteriol.*, **38**, 285.
- WOOSTER, R. C., et CHELDELIN, V. H. 1945 *Arch. Biochem.*, **8**, 311.

VI

INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR
LA TENEUR DU LAIT EN ACIDE ASCORBIQUE

THE NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
WASHINGTON, D. C. 20540

VI

INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA TENEUR DU LAIT EN ACIDE ASCORBIQUE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

L'acide ascorbique joue un rôle important dans les actions énergétiques des cellules vivantes. Par son pouvoir oxydo-réducteur, il remplit la fonction d'accepteur intermédiaire au cours des oxydations et des hydrogénations intracellulaires. Il possède, en outre, la propriété de stimuler la croissance.

Il peut exercer de deux façons principales son action stimulante sur les cellules microbiennes : 1. Il rend possible en aérobiose la culture des anaérobies. En effet, plusieurs auteurs ont démontré que l'acide ascorbique facilite le développement des bactéries anaérobies, même les plus sensibles, dans des conditions aérobies (Ehrismann, 1936 ; Kligler et Guggenheim, 1938 ; Illenyi, 1939 ; Illenyi et Busing, 1939 ; Patocka et Ilavsky, 1939). 2. Il joue le rôle de facteur de croissance, particulièrement chez les protozoaires et les spirochètes (Cailleau 1938-39a; 1938-39b; 1938-39c; 1938-39d; Lwoff, 1938-39a; 1938-39b; Lwoff et Chorine, 1943).

DESTRUCTION MICROBIENNE DE L'ACIDE ASCORBIQUE

Un grand nombre de microorganismes détruisent la vitamine C. Stepp et Schroder (1935) ont étudié une souche d'*Escherichia coli* capable de décomposer l'acide ascorbique. Kendall et Chinn (1938) ont isolé plusieurs souches de *Mucosus capsulatus* et d'entérocoques douées de la même propriété. Ce serait une caractéristique de souches plutôt que d'espèces.

D'après ces mêmes auteurs, le glucose retarderait la fermentation de l'acide ascorbique par les bactéries intestinales, les entérocoques et certains membres de l'espèce *Mucosus capsulatus*.

Young et James (1942) ont spécialement étudié l'action des bactéries intestinales sur l'acide ascorbique. Leurs constatations se résument ainsi : a. plusieurs souches d'*Escherichia coli* et d'*Aerobacter aerogenes*, isolées d'excréments humains, décomposent la vitamine C en conditions aérobies et anaérobies ; b. les genres *Proteus* et *Alcaligenes* n'attaquent pas la vitamine, mais la protègent contre l'oxydation atmosphérique, en l'absence de bactéries destructrices ; c. la présence de glucose ou de lactose protège la vitamine C contre l'oxydation par les bactéries fécales et les cultures pures d'*Escherichia coli*. Cette action protectrice a lieu aussi bien en conditions aérobies qu'anaérobies, mais elle disparaît dès que les sucres ont été utilisés.

Einhauser (1936), Hetenyi (1935) et Marin (1936) émettent l'hypothèse que le manque de réaction à une diète riche en vitamine C et les réactions positives aux injections intramusculaires et intraveineuses indiquent une destruction bactérienne de la vitamine C dans la voie gastro-intestinale.

Young et Rettger (1943) cherchent une explication à ce phénomène et constatent que la plupart des bactéries intestinales, y compris les entérocoques, ont la propriété de décomposer la vitamine C.

D'autre part, Ray *et al.* (1941) étudient six types de bactéries isolées du rumen, du duodénum et du colon de bovidés et constatent que ces bactéries détruisent aussi la vitamine C.

SYNTHÈSE MICROBIENNE DE L'ACIDE ASCORBIQUE

Si divers microorganismes détruisent la vitamine C, d'autres la réduisent ou la protègent contre l'oxydation alors qu'un troisième groupe semble la synthétiser soit *in vitro* ou *in vivo*.

Selon Rahn et Hegarty (1938), l'addition d'acide ascorbique aux cultures de *Streptococcus lactis* affaiblies ou atténuées stimule la fermentation, alors qu'elle est sans effet sur les cultures normales, ce qui signifierait qu'elles peuvent se suffire à elles-mêmes.

Balsamelli (1938) signale que *Bacillus bulgaricus* et le streptocoque lactique synthétisent la vitamine C en quantité réduite. L'effet de la culture sur le cobaye carencé serait cependant très net.

Palladina et Anoshkina (1937) rapportent que la vitamine C, détruite par la chaleur se régénère dans la plupart des cas pendant la fermentation lactique. Plusieurs bactéries lactiques ont sur la teneur en vitamine C du lait un effet spécifique. *Streptococcus lactis* et *S. cremoris* ne modifient généralement pas la teneur en vitamine du lait pendant la fermentation ; mais quelques espèces bactériennes la réduisent partiellement, surtout au début de la fermentation. Les démarreurs industriels, produisant l'arôme du beurre (*S. lactis*, *S. cremoris* et *S. citrovorus*), régénèrent généralement toute la teneur en vitamine du lait soumis à la fermentation, alors que la plupart des lactobacilles ne la modifient pas.

Toutefois, certaines bactéries lactiques cylindriques, isolées en Russie, peuvent former de la vitamine C pendant la fermentation du lait, la teneur par litre pouvant atteindre 90 mg., soit quatre fois celle du lait.

Buruiana et Volintin (1939), contrairement aux auteurs russes précédents, n'observent aucune action synthétisante des ferments lactiques dans le lait. L'augmentation du taux d'acide ascorbique serait le résultat de la réduction de l'acide déshydroascorbique, oxydé pendant les manipulations. Busing et Peters (1940) provoquèrent un cas typique de formation de vitamine C par *B. prodigiosus*. À la dose quotidienne de 50 ml de filtrat de la culture de *B. prodigiosus*, des cobayes carencés en vitamine C se maintinrent en bonne santé. Les témoins moururent du scorbut en onze à seize jours.

La synthèse de l'acide ascorbique se rencontre aussi chez les moisissures. Huber et Galli (1945) l'ont démontrée chez *Aspergillus niger*.

BIOSYNTHÈSE INTESTINALE

De nombreux travaux tentent à prouver la synthèse microbienne de la vitamine C dans le système digestif des animaux, spécialement des ruminants.

Pearsons (1920), Pearsons et Hutton (1924), Lepkovsky et Nelson (1924) constatent que les rats, nourris de rations scorbutiques pour les cobayes, peuvent vivre normalement pendant plusieurs générations. Ils en concluent que ces animaux peuvent synthétiser la vitamine C.

Crowther (1922) alimente des porcs en croissance avec une ration de céréales pauvre en vitamine C et ne note pas d'amélioration en lui ajoutant plus tard des aliments verts riches en ce facteur.

White et Roberts (1923), durant cent douze jours, servent à un lot de porcs une ration carencée en vitamine C et à un lot témoin recevant le même régime de base, ils servent des aliments verts à volonté. Les porcs du premier groupe font un gain de 1.37 lb par jour comparativement à 1.35 lb pour ceux du groupe témoin. Les porcs se portent bien dans les deux cas.

Selon Orr et Crichton (1924), le porc est peu sensible au scorbut. Les observations laissent supposer une biosynthèse intestinale suffisante.

Madsen *et al.* (1935), dans des études sur les moutons, arrivent à des conclusions semblables à celles des auteurs précédents. On n'a noté aucun symptôme de scorbut après 483 jours d'un régime dépourvu de vitamine C.

Thurston *et al.* (1926, 1929) et Ray *et al.* (1941) constatent la synthèse de la vitamine C chez des veaux carencés et l'attribuent aux bactéries intestinales.

Hugues *et al.* (1927), Ray *et al.* (1941), Knight *et al.* (1941) et Wallis (1943) ont étudié le sort de la vitamine C chez la vache laitière et ses possibilités de biosynthèse. Selon ces auteurs, la concentration du lait et du sérum sanguin

en vitamine C est stable et l'élimination de cette vitamine soit par l'urine, le lait ou les excréments peut parfois excéder de beaucoup l'ingestion, ce qui laisse supposer une importante synthèse dans la voie gastro-intestinale.

Hart *et al.* (1925) révèlent le peu d'exigence des poussins en vitamine C. Cependant la synthèse ne semble pas suffisante. Reid (1950) rapporte un gain de croissance pouvant atteindre plus de 50% chez les poulets recevant de la vitamine C dans leur ration comparativement aux témoins.

SOMMAIRE

Un groupe varié et imposant de microorganismes utilise la vitamine C du milieu ambiant pour sa croissance et l'exercice de ses fonctions physiologiques ; un deuxième groupe réduit l'acide ascorbique partiellement oxydé ou le protège contre l'oxydation, lui conservant ainsi ses propriétés biologiques ; enfin, certains microorganismes synthétisent la vitamine C. *Bacillus prodigiosus* et *Aspergillus niger* en sont des exemples. En ce qui concerne les bactéries lactiques, la preuve de leur pouvoir synthétique reste à faire.

Dans la voie intestinale de l'homme et des animaux, les microorganismes effectuent parfois une destruction incontestable et importante de vitamine C, ce qui explique des réactions négatives à de fortes ingestions de cette vitamine dans certains cas pathologiques.

Par contre, il n'y a pas de doute que la biosynthèse intestinale de la vitamine C est un phénomène constant de la plus haute utilité chez la plupart des espèces animales, particulièrement chez les ruminants.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE L'INFLUENCE DES BACTÉRIES LACTIQUES SUR LA TENEUR DU LAIT EN ACIDE ASCORBIQUE*

La littérature consacre plusieurs pages à l'étude de l'influence des bactéries lactiques sur la teneur du lait en acide ascorbique (Balsamelli, 1938 ; Buruiana et Volintin, 1939). On ne possède cependant pas la preuve directe de la synthèse, et les résultats obtenus (Palladina et Anoshkina, 1937) ne seraient que la manifestation d'une fonction de protection de la part des bactéries. Plusieurs bactéries lactiques transforment, en effet, l'acide déshydroascorbique en acide ascorbique (Buruiana et Volintin, 1939). De plus, l'acidité développée durant la fermentation du lactose stabilise l'acide déshydroascorbique (Sommer, 1948).

Nous tenterons de saisir l'influence quantitative de plusieurs bactéries lactiques sur la teneur du lait en acide ascorbique.

À différentes périodes d'incubation, nous déterminerons la teneur du lait en vitamine C et son degré d'acidité totale ; nous tenterons aussi de saisir une corrélation entre ces deux valeurs.

*Travail exécuté en 1952.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cultures bactériennes

Nous avons recruté trois souches dans chacune des dix espèces suivantes : *Thermobacterium yoghourtii*, *T. bulgaricum*, *T. acidophilum*, *Streptococcus thermophilus*, *S. paracitrovorus*, *S. cremoris*, *S. lactis*, *S. liquefaciens*, *Lactobacillus casei* et *Propionibacterium shermanii*. Nous avons aussi choisi trois souches de yoghourt et trois souches de kéfir. Ces associations renferment respectivement les espèces suivantes : *Thermobacterium yoghourtii*, *T. bulgaricum* et *Streptococcus thermophilus* ainsi que *Lactobacillus caucasicus*, *L. casei*, *Streptococcus kefir*, *Saccharomyces fragilis* et *Torula kefir*.

Toutes ces souches ont une grande valeur industrielle ; on les entretient en cultures pures par des repiquages fréquents dans du lait écrémé stérile enrichi de 0.2% de levure et de 3% de carbonate de calcium.

Pour chacune des douze espèces et associations, six flacons contenant 100 ml de lait écrémé, chauffé à 100 C pendant trente minutes et refroidi à la température optimum d'incubation, sont inoculés en duplicata avec 2% de culture de chacune des trois souches. Les duplicatas reçoivent 0.5% de chloroforme et constituent les témoins.

Des échantillons sont immédiatement prélevés pour les déterminations de l'acidité et de la teneur vitaminique. Les six flacons demeurent à l'incubateur jusqu'à coagulation, alors que de nouveaux échantillons sont prélevés. Les six flacons sont par la suite conservés à la température de la chambre. Les déterminations sont répétées après 48 heures et une semaine d'incubation.

Description de la méthode

Dans nos déterminations, nous suivons la méthode de Bessey et King (1933) adaptée à la détermination de l'acide ascorbique du lait par Sharp (1938). Cette méthode a pour principe la réduction d'un colorant, en occurrence le 2,6-dichlorophénolindophénol, par une solution acide d'acide ascorbique (*Association of Vitamin Chemists, Inc.*, 1951).

L'enlèvement des protéines du lait s'avère inutile, car le lait ne contient pas de substances nuisibles à la réaction (Sharp, 1938). La titration directe et visuelle du lait préalablement acidifié en présence des protéines donne aussi de meilleurs résultats, car la filtration ne vient pas causer l'absorption ou la destruction de la vitamine (Sharp, 1938).

La méthode de Sharp ne dose que l'acide ascorbique réduit (Hand, 1943). Elle nous permet cependant d'apprécier le rôle protecteur ou destructif des bactéries et leur puissance à réduire l'acide déshydroascorbique. Elle est cependant moins certaine dans l'appréciation de la synthèse.

Échantillonnage. L'acide ascorbique est un puissant réducteur et subit facilement l'oxydation en acide déshydroascorbique qui ne réduit plus le colorant (*Association of Vitamin Chemists, Inc.*, 1951). On doit donc prévenir les contaminations par les substances qui favorisent, catalysent l'oxydation : le cuivre (*Association of Vitamin Chemists, Inc.*, 1951), le fer (Gawron et Berg, 1944 ; Lorenz et Arnold, 1938), l'oxydase de l'acide ascorbique (Tauber *et al.*, 1935) et le gaz sulfureux (Levy, 1943 ; Mapson, 1942) particulièrement. On devra donc employer une verrerie très propre durant toute la durée des expériences, lors du prélèvement des échantillons particulièrement.

Le traitement du lait avant la pasteurisation revêt peu d'importance cependant dans la poursuite de nos expériences. En effet, les six flacons de culture contiennent du lait soumis au même traitement. De plus, nous avons veillé à ce que les témoins subissent rigoureusement le même traitement durant toute la durée des expériences.

Réactifs.

Solutions de 10 N H_2SO_4 et N/10 H_2SO_4 .

Solutions de N NaOH et N/10 NaOH.

Solution de Bleu de Brome-Thymol à 0.02%.

Solution standard d'acide ascorbique : on la prépare par dissolution de 50 mg d'acide ascorbique dans 500 ml d'eau distillée. Cette solution est instable et doit servir immédiatement à la standardisation du colorant. S'il est impossible de standardiser le colorant dans les cinq minutes qui suivent la préparation de la vitamine, on doit reprendre la préparation de la solution d'acide ascorbique.

Solution de 2,6-dichlorophénolindophénol préparée par macération dans un mortier de 30 pastilles contenant chacune 2 mg de colorant (Hoffman-LaRoche) avec 50 ml d'eau distillée chaude. Après décantation sur un papier-filtre, le filtrat est recueilli dans un flacon volumétrique de 250 ml. De l'eau distillée chaude est ajoutée au résidu du mortier et décantée de nouveau. Ce procédé se continue jusqu'à ce que le colorant bleu ait passé le filtre. Le colorant est refroidi à la température de la chambre, complété au trait de jauge avec de l'eau distillée et conservé au réfrigérateur à 3 C. La solution est renouvelée chaque semaine.

Standardisation du colorant. 5 ml de la solution standard d'acide ascorbique sont placés dans un beaker de 200 ml et additionnés de 15 ml de N/10 H_2SO_4 et 15 ml d'eau distillée. La solution colorée est ajoutée au moyen d'une pipette graduée au 0.05 ml. Le point final est indiqué par la couleur rose pâle qui doit persister pendant 30 secondes. T représente le nombre de ml de colorant nécessaire à la production de cette couleur. La standardisation est répétée quotidiennement.

On recommence la détermination sur le mélange acide-eau pour obtenir la valeur témoin T_1 (0.3 ml approximativement). Ces deux déterminations nous permettent de calculer l'équivalent E qui exprime le nombre de ml d'acide ascorbique correspondant à 1 ml de la solution colorée :

$$1) \quad E = \frac{C}{T - T_1}$$

où C égale le nombre de mg d'acide ascorbique contenu dans 5 ml de la solution standard, soit 0.5. Le colorant est calibré de façon que E varie entre 0.05 et 0.08.

Détermination de l'acide ascorbique dans le lait

Deux échantillons de chacun des six flacons de culture bactérienne sont recueillis. Le premier échantillon (9 ml) sert à la détermination de l'acidité totale qui s'effectue par addition à l'échantillon de 1 ml de bleu de brome-thymol à 0.02% et N/10 NaOH jusqu'à neutralisation à un pH de 6.8. On exprime l'acidité en ml N/10 NaOH.

Le deuxième échantillon (10 ml) est déposé dans un beaker de 250 ml et reçoit 25 ml N/10 H_2SO_4 pour stabiliser la vitamine. Il est titré immédiatement par le colorant au moyen d'une pipette graduée au 0.05 ml. À mesure que le colorant est ajouté, le lait prend une couleur rose qui disparaît après quelques secondes. Il faut continuer l'addition de colorant jusqu'à ce que la couleur persiste au moins trente secondes. Une fois le point final atteint, la couleur peut persister pendant plusieurs minutes. La valeur L est le nombre de ml de colorant nécessaire pour l'obtention du point final. Comme on ne cherche pas à obtenir une valeur absolue en acide ascorbique, il n'est pas nécessaire de doser un témoin après destruction de la vitamine dans le même échantillon par conservation prolongée, par addition de sulfate de cuivre ou par exposition aux rayons ultra-violets.

Calculs. La formule suivante indique le nombre de mg d'acide ascorbique contenu dans 100 ml de lait, quand l'échantillon est de 10 ml :

$$2) \quad V = 10 \ L \times E$$

où E est égal à l'équivalent en acide ascorbique et L au nombre de ml de colorant nécessaire pour neutraliser l'acide ascorbique de l'échantillon de 10 ml de lait. En condensant 1) et 2), on obtient la formule développée :

$$3) \quad V = \frac{L \times C}{T - T_1}$$

Exemple -

Il faut 10.3 ml de colorant pour neutraliser 5 ml de la solution standard d'acide ascorbique. Le témoin acide-eau marque 0.3 ml. La lecture sur un échantillon de 10 ml de lait est 4 ml.

L'équivalent E est donc :

$$1) \quad E = \frac{0.5}{10.3-0.3} = \frac{0.5}{10} = 0.05$$

L'échantillon contient :

$$4 \times 0.05 = 0.2 \text{ mg de vitamine C}$$

et 100 ml de lait contiennent :

$$0.2 \times 10 = 2.0 \text{ mg de vitamine C}$$

La formule développée 3) nous conduit au même résultat :

$$V = \frac{4 \times 0.5}{10.3 - 0.3} \times 10 = 2.0 \text{ mg de vitamine C}$$

RÉSULTATS

Nous reproduisons, dans les Tableaux I-52 à I-63, la teneur en acide ascorbique de 36 cultures microbiennes, à quatre périodes différentes d'incubation. Ces déterminations nous révèlent l'influence de chaque souche sur la teneur du lait en acide ascorbique réduit après coagulation, laquelle correspond à peu près à la fin de la phase logarithmique de croissance, après 48 heures et une semaine d'incubation. Les trois souches nous ont permis de calculer une moyenne dont

TABLEAU I-52

*Influence de Thermobacterium yoghourtii
sur la teneur du lait en acide ascorbique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		mg D'ACIDE ASCORBIQUE PAR 100 ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
1	0	1.8	1.8	1.48	1.48		
	4	1.8	3.5	0.66	0.66	-0.82	0.00
	48	2.2	13.5	0.50	0.36	-0.98	-0.14
	168	2.7	24.1	0.29	0.32	-1.19	0.03
1c	0	1.8	1.8	1.10	1.10		
	4	2.0	8.3	0.57	0.56	-0.53	-0.01
	48	3.0	16.2	0.37	0.31	-0.73	-0.06
	168	5.0	24.3	0.26	0.25	-0.84	-0.01
1d	0	1.9	1.9	1.40	1.40		
	4	2.0	9.3	0.58	0.49	-0.82	-0.09
	48	3.1	16.7	0.39	0.31	-1.01	-0.08
	168	5.6	19.6	0.21	0.29	-1.19	0.08

TABLEAU I-53

*Influence de Thermobacterium bulgaricum
sur la teneur du lait en acide ascorbique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		mg D'ACIDE ASCORBIQUE PAR 100 ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
2b	0	1.9	1.9	1.20	1.20		
	4	2.0	6.3	0.65	0.65	-0.55	0.00
	48	3.0	16.9	0.40	0.37	-0.80	-0.03
	168	4.3	22.8	0.19	0.22	-1.01	0.03
2c	0	1.9	1.9	1.28	1.28		
	4	2.2	5.8	0.72	0.62	-0.56	-0.10
	48	2.8	16.7	0.30	0.41	-0.98	0.11
	168	4.1	22.0	0.25	0.18	-1.03	-0.07
2d	0	1.9	1.9	1.15	1.15		
	4	3.5	7.0	0.57	0.60	-0.58	0.03
	48	3.5	16.1	0.34	0.30	-0.81	-0.04
	168	4.1	19.0	0.22	0.24	-0.93	0.02

TABLEAU I-54

*Influence de Streptococcus thermophilus
sur la teneur du lait en acide ascorbique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		mg D'ACIDE ASCORBIQUE PAR 100 ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
4	0	1.6	1.6	2.04	2.04		
	4	2.1	4.8	1.13	0.95	-0.91	-0.18
	48	2.6	6.1	0.43	0.57	-1.61	0.14
	168	3.4	7.1	0.28	0.25	-1.76	-0.03
4a	0	1.7	1.7	1.93	1.93		
	4	2.1	4.9	0.96	0.83	-0.97	-0.13
	48	2.5	5.9	1.00	1.29	-0.93	0.29
	168	3.0	6.9	0.28	0.35	-1.65	0.07
4b	0	1.8	1.8	1.91	1.91		
	4	2.2	5.4	0.96	0.83	-0.95	-0.13
	48	2.6	7.2	1.14	0.77	-0.77	-0.37
	168	4.4	8.2	0.25	0.26	-1.66	0.01

TABLEAU I-55

*Influence de Thermobacterium acidophilum
sur la teneur du lait en acide ascorbique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		mg D'ACIDE ASCORBIQUE PAR 100 ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
7	0	1.9	1.9	1.29	1.29		
	4	1.9	3.9	0.81	0.57	-0.48	-0.24
	48	2.3	7.0	0.31	0.31	-0.98	0.00
	168	2.3	7.6	0.29	0.26	-1.00	-0.03
7c	0	1.9	1.9	1.29	1.29		
	4	2.1	4.0	0.46	0.59	-0.83	0.13
	48	2.5	7.1	0.36	0.33	-0.93	-0.03
	168	2.8	10.0	0.29	0.28	-1.00	-0.01
7d	0	1.8	1.8	1.35	1.35		
	4	2.0	4.0	0.59	0.57	-0.76	-0.02
	48	2.2	7.2	0.31	0.30	-1.04	-0.01
	168	3.0	9.8	0.28	0.32	-1.07	0.04

TABLEAU I-56

Influence des bactéries du Yoghourt
sur la teneur du lait en acide ascorbique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		mg D'ACIDE ASCORBIQUE PAR 100 ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
3a	0	1.8	1.8	2.08	2.08		
	4	3.1	8.0	0.99	0.93	-1.09	-0.06
	48	3.4	10.8	0.31	0.36	-1.77	0.05
	168	3.5	12.4	0.25	0.25	-1.83	0.00
Da	0	1.8	1.8	2.21	2.21		
	4	1.8	5.3	1.12	0.96	-1.09	-0.16
	48	2.3	7.1	0.26	0.31	-1.95	0.05
	168	2.6	7.4	0.25	0.26	-1.96	0.01
De	0	1.7	1.7	2.10	2.10		
	4	1.9	5.5	0.92	0.87	-1.18	-0.05
	48	2.4	7.8	0.29	0.26	-1.81	-0.03
	168	3.0	8.3	0.33	0.28	-1.77	-0.05

**Thermobacterium yoghourtii*, *Thermobacterium bulgaricum* et *Streptococcus thermophilus*.

TABLEAU I-57

*Influence de Streptococcus paracitrovorus
sur la teneur du lait en acide ascorbique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		mg D'ACIDE ASCORBIQUE PAR 100 ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
5a	0	1.9	1.9	2.17	2.17		
	24	1.9	3.3	1.23	1.30	-0.94	0.07
	48	1.9	4.2	0.40	0.96	-1.77	0.56
	168	3.0	7.0	0.31	0.65	-1.86	0.34
5b	0	1.9	1.9	2.12	2.12		
	24	1.9	7.6	1.25	1.26	-0.87	0.01
	48	1.9	7.9	0.39	0.38	-1.73	-0.01
	168	2.3	7.9	0.33	0.65	-1.79	0.32
5d	0	1.8	1.8	2.12	2.12		
	24	1.9	4.5	1.10	0.97	-1.02	-0.13
	48	1.9	8.3	0.64	0.36	-1.48	-0.28
	168	2.3	8.5	0.33	0.40	-1.79	0.07

TABLEAU I-58

*Influence de Streptococcus cremoris
sur la teneur du lait en acide ascorbique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		mg D'ACIDE ASCORBIQUE PAR 100 ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
6b	0	1.9	1.9	2.17	2.17		
	24	3.1	6.8	1.32	0.97	-0.85	-0.35
	48	3.5	7.9	0.76	0.37	-1.41	-0.39
	168	4.3	7.9	0.22	0.31	-1.95	0.09
6c	0	1.9	1.9	2.12	2.12		
	24	2.0	2.8	1.27	1.38	-0.85	0.11
	48	2.0	4.1	0.85	0.72	-1.27	-0.13
	168	2.8	6.3	0.27	0.30	-1.85	0.03
6d	0	1.8	1.8	2.12	2.12		
	24	1.8	3.0	1.18	1.09	-0.94	0.09
	48	1.8	4.2	0.60	0.82	-1.52	0.22
	168	2.6	6.7	0.19	0.29	-1.93	0.10

TABLEAU I-59

*Influence de Propionibacterium shermanii
sur la teneur du lait en acide ascorbique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		mg D'ACIDE ASCORBIQUE PAR 100 ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
9a	0	1.2	1.2	2.55	2.55		
	24	2.5	5.0	1.31	1.28	-1.24	-0.03
	48	3.3	7.0	0.92	0.99	-1.63	0.07
	168	4.3	9.2	0.42	0.45	-2.13	0.03
9b	0	1.2	1.2	2.55	2.55		
	24	3.8	4.5	1.16	1.51	-1.39	0.35
	48	4.2	7.0	0.79	1.41	-1.76	0.62
	168	5.5	10.3	0.34	0.89	-2.21	0.55
9g	0	1.2	1.2	2.58	2.58		
	24	3.3	3.9	1.34	1.46	-1.24	0.12
	48	4.2	7.4	0.82	1.15	-1.76	0.33
	168	5.4	10.3	0.13	0.78	-2.45	0.65

TABLEAU I-60

*Influence de Streptococcus lactis
sur la teneur du lait en acide ascorbique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		mg D'ACIDE ASCORBIQUE PAR 100 ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
10a	0	1.1	1.1	2.49	2.49		
	24	2.4	2.9	1.50	1.55	-0.99	0.05
	48	2.7	4.7	0.72	0.89	-1.77	0.17
	168	3.5	5.8	0.33	0.49	-2.16	0.16
10b	0	1.2	1.2	2.51	2.51		
	24	2.8	6.3	1.21	1.16	-1.30	-0.05
	48	3.2	7.5	0.69	0.64	-1.82	-0.05
	168	4.1	8.1	0.34	0.31	-2.17	-0.03
10c	0	1.3	1.3	2.45	2.45		
	24	3.3	6.5	1.35	1.10	-1.10	-0.25
	48	3.9	7.9	0.70	0.62	-1.75	-0.08
	168	4.5	8.2	0.35	0.34	-2.10	-0.01

TABLEAU I-61

*Influence de Streptococcus liquefaciens
sur la teneur du lait en acide ascorbique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		mg D'ACIDE ASCORBIQUE PAR 100 ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
16a	0	1.5	1.5	2.53	2.53		
	24	1.9	3.6	1.29	0.96	-1.24	-0.33
	48	1.9	4.6	0.89	1.20	-1.64	0.31
	168	2.5	9.8	0.30	0.53	-2.23	0.23
18	0	1.6	1.6	2.53	2.53		
	24	2.0	4.6	1.26	1.23	-1.27	-0.03
	48	2.0	7.0	0.77	1.49	-1.76	0.72
	168	2.9	8.2	0.39	0.49	-2.14	0.05
18a	0	1.6	1.6	2.53	2.53		
	24	1.9	4.6	1.22	1.15	-1.31	-0.07
	48	2.2	7.0	0.79	1.20	-1.74	0.41
	168	2.7	8.4	0.39	1.09	-2.14	0.70

TABLEAU I-62
*Influence de Lactobacillus casei
sur la teneur du lait en acide ascorbique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		mg d'ACIDE ASCORBIQUE PAR 100 ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
8	0	1.6	1.6	2.55	2.55		
	24	1.9	4.9	1.36	1.49	-1.19	0.13
	48	2.3	8.5	0.76	1.29	-1.79	0.53
	168	2.9	12.0	0.27	0.65	-2.28	0.38
8a	0	1.6	1.6	2.66	2.66		
	24	1.7	6.8	1.45	1.65	-1.21	0.20
	48	2.2	7.4	0.99	1.32	-1.65	0.33
	168	3.2	12.0	0.34	0.54	-2.32	0.20
8b	0	1.6	1.6	2.58	2.58		
	24	2.4	5.2	1.41	1.48	-1.17	0.07
	48	2.7	8.0	1.03	1.23	-1.55	0.20
	168	3.3	9.3	0.30	0.59	-2.28	0.29

TABLEAU I-63
Influence des microorganismes du kéfir
sur la teneur du lait en acide ascorbique*

SOUCHES	ÂGE (HRES)	ACIDITÉ TOTALE ML N/10 NaOH		mg d'ACIDE ASCORBIQUE PAR 100 ML DE LAIT			
		TÉMOIN	CULTURE	TÉMOIN	CULTURE	PERTE OU GAIN	
						INCUBA- TION	BACTÉ- RIES
O	0	--	1.3	--	0.93		
	24	--	6.5	--	0.76	--	-0.17
	48	--	8.2	--	1.57	--	0.81
	168	--	19.6	--	0.96	--	0.03
A	0	--	1.8	--	0.93		
	24	--	4.8	--	0.51	--	-0.42
	48	--	9.5	--	2.00	--	1.49
	168	--	18.5	--	0.54	--	-0.39
NB	0	--	2.1	--	0.90		
	24	--	7.0	--	0.56	--	-0.34
	48	--	12.0	--	1.34	--	0.78
	168	--	19.4	--	0.67	--	-0.23

**Lactobacillus caucasicus*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus kefir*, *Saccharomyces fragilis* et *Torula kefir*.

nous avons tracé la résultante dans les figures I-17 à I-20. Ces figures groupent les bactéries lactiques en quatre catégories : les thermophiles, les mésophiles A, les mésophiles B et le kéfir ; leur température optimum d'incubation se situe à 41 C, 37 C, 22 C et 22 C respectivement.

Des essais préliminaires sur différents laits du mois de décembre nous révélèrent une teneur d'environ 2.00 mg d'acide ascorbique par 100 ml de lait. Nous avons enregistré, au cours de nos travaux, des variations entre 1.20 et 2.49 mg et une moyenne de 1.91.

Les laits utilisés pour nos expériences n'ont reçu aucun traitement particulier de nature à leur conserver une teneur élevée en vitamine C de la traite au début de nos expériences. Après la pasteurisation, nous avons pris cependant toutes les précautions nécessaires pour prévenir des contaminations de nature à altérer la teneur vitaminique.

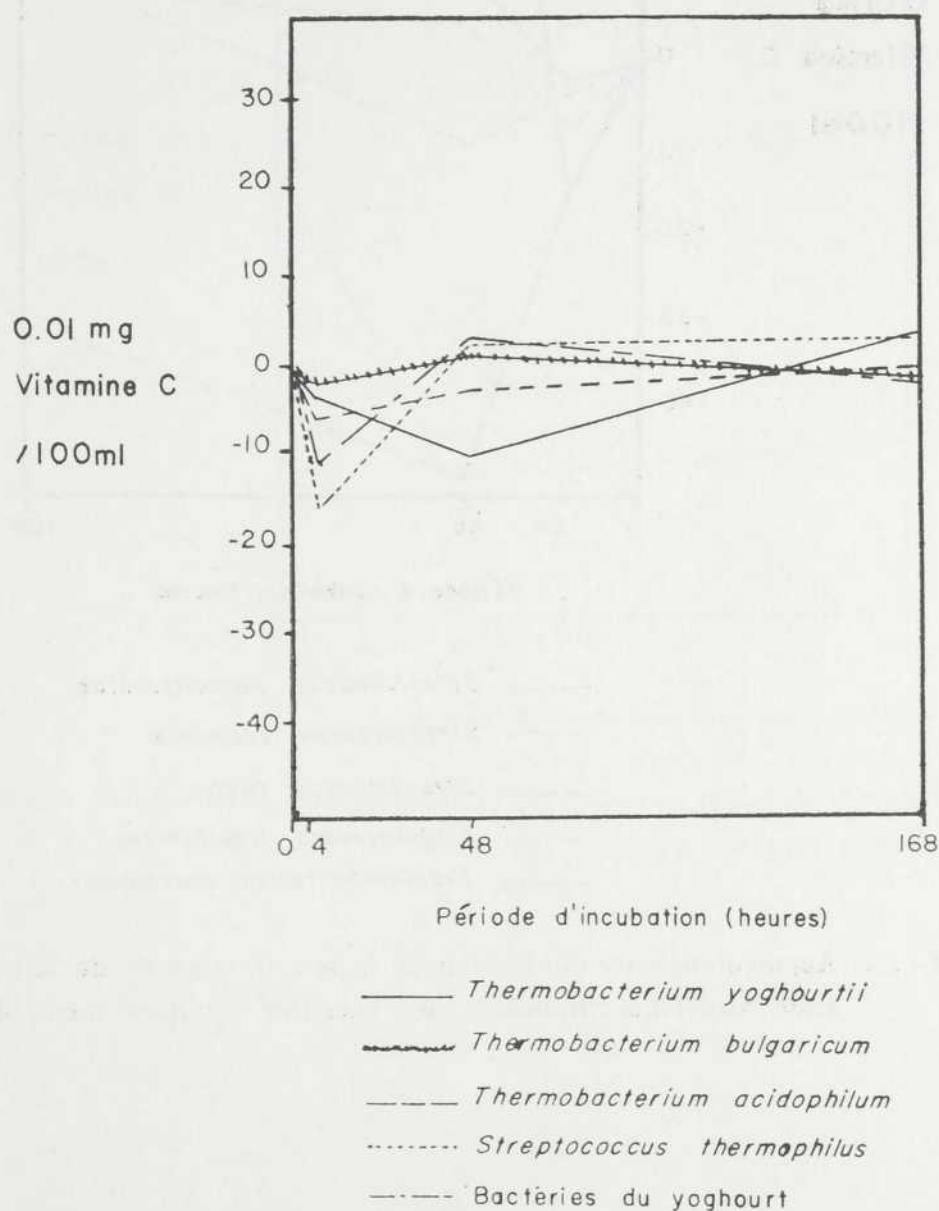


Figure I-17. Augmentation ou diminution de la teneur originale du lait (O) en acide ascorbique. Influence des bactéries lactiques thermophiles.

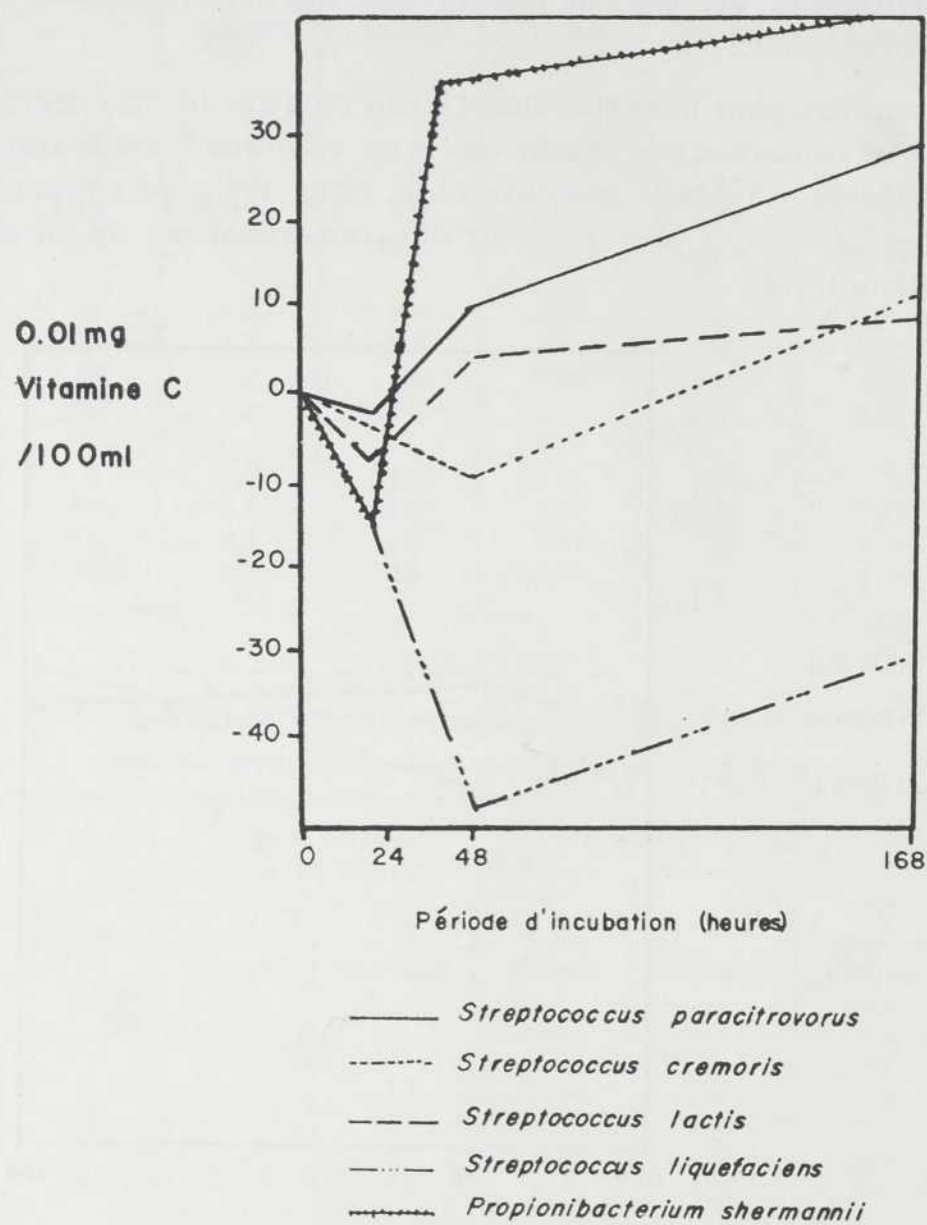


Figure I-18. Augmentation ou diminution de la teneur originale du lait (O) en acide ascorbique. Influence des bactéries lactiques mésophiles A.

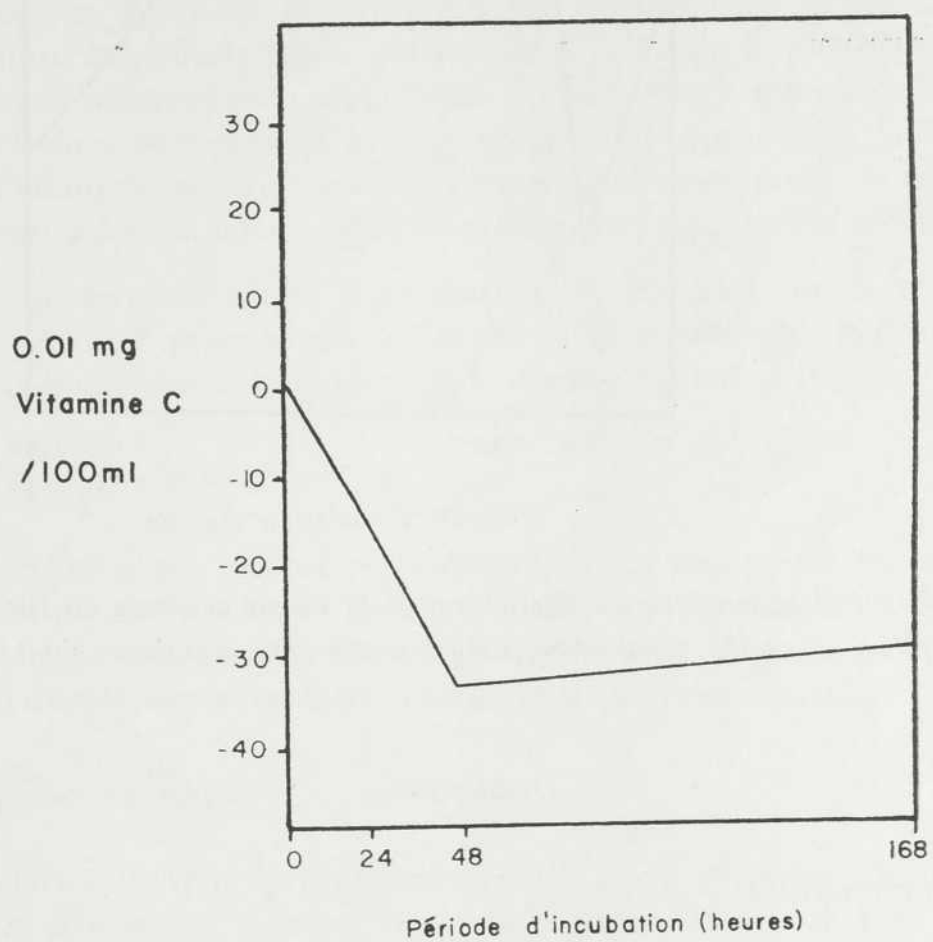


Figure I-19. Augmentation ou diminution de la teneur originale du lait (O) en acide ascorbique. Influence des bactéries lactiques mésophiles B.

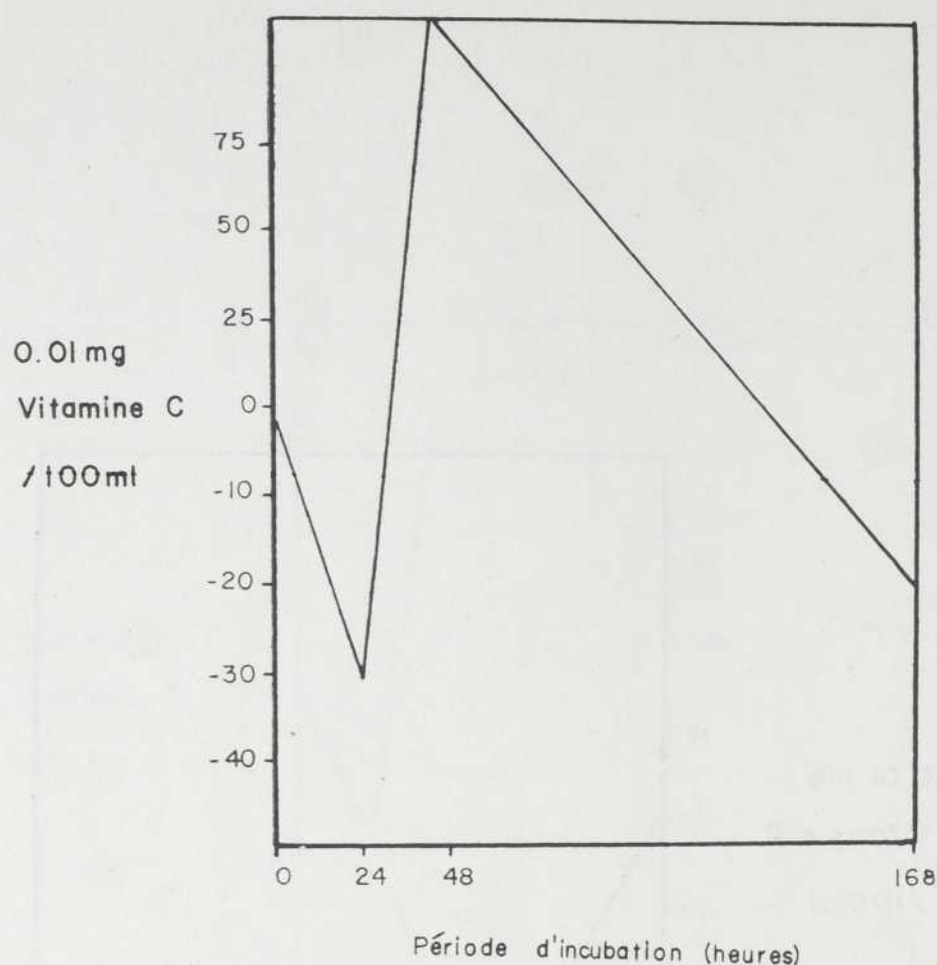


Figure I-20. Augmentation ou diminution de la teneur originale du lait (O) en acide ascorbique. Influence des microorganismes du kéfir.

DISCUSSION

Bactéries Thermophiles –

Toutes ces bactéries utilisent l'acide ascorbique au début de leur croissance. L'acide ascorbique semble jouer ici un rôle réducteur. Les cellules doivent établir dans leur environnement un potentiel d'oxydo-réduction convenable à leur croissance microaérophilique.

Une fois le lait coagulé et la phase logarithmique de croissance terminée, toutes les espèces, excepté *Thermobacterium yoghourtii*, synthétisent ou restituent la vitamine en des proportions égales à l'utilisation initiale. *Thermobacterium yoghourtii*, durant cette deuxième phase, a encore besoin de la vitamine pour maintenir le potentiel d'oxydo-réduction.

Durant la dernière phase d'incubation, les thermophiles n'ont plus besoin de la vitamine C, et la concentration de celle-ci se maintient à son niveau original.

Une exception se présente pour *Thermobacterium yoghourtii* qui, durant cette période, restitue au milieu l'acide ascorbique qu'il lui avait emprunté durant les deux premières phases de sa croissance.

Bactéries Mésophiles A –

Comme les thermophiles, les mésophiles A empruntent au lait de légères quantités d'acide ascorbique nécessaire à l'établissement d'un potentiel d'oxydo-réduction convenable à leur croissance.

Streptococcus cremoris et *Streptococcus liquefaciens* utilisent encore la vitamine durant la seconde phase qui débute à la fin de la phase logarithmique de croissance, au moment de la coagulation du lait. *Streptococcus paracitrovorus*, *Propionibacterium shermanii* et *Streptococcus lactis* synthétisent la vitamine ou réduisent la vitamine oxydée durant la même période, et, pour ces microorganismes, la concentration du lait en acide ascorbique dépasse alors la teneur originale.

Durant la dernière phase d'incubation, la synthèse ou la réduction est générale et parallèle pour toutes les espèces. Dans tous les cas, excepté chez *Streptococcus liquefaciens*, la teneur finale dépasse la teneur initiale.

Bactéries Mésophiles B –

Lactobacillus casei, le seul représentant de ce groupe de bactéries, utilise l'acide ascorbique durant les 48 heures qui suivent l'inoculation. La courbe se redresse durant la troisième période, l'utilisation cesse, mais la teneur finale du lait en vitamine C demeure bien inférieure au niveau initial.

Microorganismes du kéfir –

Les bactéries du kéfir empruntent au lait l'acide ascorbique nécessaire pour amorcer leur croissance. Durant la seconde phase, le lait se voit restituer la vitamine ; la synthèse ou la réduction est considérable, et la concentration dans le lait dépasse beaucoup la teneur initiale.

Les cellules de levures supplantent les bactéries durant la dernière phase de croissance et utilisent de grandes quantités d'acide ascorbique pour établir les conditions d'anaérobiose favorables à la production d'alcool. La teneur du lait s'abaisse considérablement et se fixe au-dessous de la teneur initiale à la fin de l'incubation.

On ne peut déceler aucune corrélation entre l'acidité et la teneur du lait en acide ascorbique. La teneur vitaminique semble plutôt liée à l'établissement du potentiel d'oxydo-réduction favorable à la croissance de chacune des bactéries et des levures. Une fois les conditions réductrices établies, l'acide ascorbique est généralement restitué au milieu.

CONCLUSION

Nous avons étudié l'influence de 12 espèces et associations de bactéries lactiques sur la teneur du lait en acide ascorbique réduit. Résumons nos résultats en quatre points :

1. L'acide ascorbique du lait s'abaisse durant la phase d'incubation qui précède la coagulation. Ce phénomène ne souffre aucune exception et semble lié à l'établissement d'un potentiel d'oxydo-réduction convenable à chaque espèce microbienne. Cette utilisation initiale est deux fois plus importante dans le kéfir que dans les autres cultures.

2. *Thermobacterium yoghourtii*, *Streptococcus cremoris* et *Lactobacillus casei* exigent encore la vitamine jusqu'à la fin de la période qui se termine 48 heures après l'inoculation du lait. Durant la même période, les autres thermophiles synthétisent ou réduisent la forme oxydée de la vitamine, de sorte qu'à la fin de la période le lait a recouvré sa teneur initiale. Chez les autres mésophiles A et le kéfir, la synthèse semble évidente durant cette période. Il est aussi possible que cette synthèse soit simulée par la réduction de l'acide déshydroascorbique qui se serait produit dans l'intervalle entre la traite et le début de nos expériences.

3. Durant la troisième période, la teneur vitaminique du lait se maintient à son niveau initial chez les thermophiles, excepté chez *Thermobacterium yoghourtii* qui synthétise. À la fin de la période cependant, la teneur est à peu près identique dans toutes les cultures, ce qui laisse croire que la synthèse est plutôt une manifestation du rôle protecteur des thermophiles vis-à-vis l'acide ascorbique. Durant la même période, les mésophiles A et les mésophiles B manifestent aussi un rôle de protection. Chez *Streptococcus paracitrovorus* et *Streptococcus lactis*, la synthèse ou la réduction est très grande ; le kéfir utilise des quantités notables d'acide ascorbique à cause des levures pour qui cette dernière phase d'incubation correspond à la phase logarithmique de croissance.

4. On ne remarque aucune corrélation entre l'acidité et la teneur du lait en vitamine C. Les variations vitaminiques semblent plutôt liées au potentiel d'oxydo-réduction.

BIBLIOGRAPHIE

- ASSOCIATION OF VITAMIN CHEMISTS, Inc. 1951 *Methods of Vitamin Assay*. 2^e éd. Interscience Publ., Inc. New York.
- BALSAMELLI, F. 1938 Recherches sur la possibilité de synthèse du facteur C de la part du *B. bulgaricus* et du streptocoque lactique. Boll. sez. ital. soc. intern. microbiol., **10**, 145-149.
- BESSEY, O. A., et KING, C. G. 1933 The distribution of vitamin C in plant and animal tissues and its determination. J. Biol. Chem., **103**, 687.
- BURUIANA, L., et VOLINTIN, V. 1939 *Recherches sur le contenu en vitamine C de quelques préparations de laits fermentés et l'influence de la fermentation lactique sur la synthèse de la vitamine C*. Tipographia Legatoria Furnica, Intrarea Colentina. Bucarest. Cité dans Le lait, **20**, 169-170.
- BUSING, K. H., et PETERS, F. 1940 Biochem. Z., **304**, 134-136.
- CAILLEAU, R. 1938-1939a Compt. rend. soc. biol., **127**, 861.
- CAILLEAU, R. 1938-1939b Compt. rend. soc. biol., **127**, 1421.
- CAILLEAU, R. 1938-1939c Compt. rend. soc. biol., **130**, 319.
- CAILLEAU, R. 1938-1939d Compt. rend. soc. biol., **131**, 964.
- CROWTHER, M. 1922 Olympia Agr. Co., Bull. No. 3.
- EHRISMANN, O. 1936 Z. Hygiene, **118**, 544.
- EINHAUSER, M. 1936 Vitamin und Gastroenteritis. Z. ges. exptl Med., **98**, 461-477.
- GAWRON, O., et BERG, R. 1944 Estimation of vitamin C in presence of iron salts. Stepwise determination of vitamin C and ferrous iron with dichlorophenolindophenol. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., **16**, 757.
- HAND, D. B. 1943 Reduced and total vitamin C in milk. J. Dairy Sci., **26**, 7.
- HART, E. B., STEENBOCK, H., et LEPROVSKY, S. 1925 J. Biol. Chem., **66**, 813.
- HETENYI, G. 1935 Therapy of ulcerative colitis with cevitamic acid. Orvosi Hetilap, **79**, 557-558.
- HUBER, M. G., et GALLI, H. 1945 Helvetica Acta, **28**, 248.
- HUGUES, J. S., FITCH, J. B., CAVE, H. W., et RIDDELL, W. H. 1927 Relation between the vitamin C content of the cow's ration and the vitamin C content of its milk. J. Biol. Chem., **71**, 309-316.
- ILLENYI, A. 1939 Zentr. Bakteriolog. Parasitenk., **114**, 502.
- ILLENYI, A., et BUSING, K. H. 1939 Zentr. Bakteriolog. Parasitenk., **114**, 72.
- KENDALL, A. I., et CHINN, H. 1938 The decomposition of ascorbic acid by certain bacteria. Studies in bacterial metabolism. J. Infectious Diseases, **62**, 330-336.
- KLIGLER, I. J., et GUGGENHEIM, K. 1938 J. Bacteriol., **35**, 141.
- KNIGHT, C. A., DUTCHER, R. A., GUERRANT, N. B., et BECHDEL, S. I. 1941 Utilization and excretion of ascorbic acid by the dairy cow. J. Dairy Sci., **24**, 567-577.
- LEPKOVSKY, S., et NELSON, M. T. 1924 J. Biol. Chem., **66**, 49.
- LEVY, L. F. 1943 The determination of ascorbic acid in the presence of sulfur dioxide. Biochem. J. (London), **37**, 713.
- LORENZ, A. J., et ARNOLD, L. J. 1938 Standardization of 2,6-dichlorophenolindophenol with ferrous compounds. Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., **10**, 687.
- LWOFF, A. 1938-1939a Compt. rend., **206**, 540.
- LWOFF, A. 1938-1939b Compt. rend. soc. biol., **130**, 406.

- LWOFF, A., et CHORINE, V. 1943 Influence de l'acide ascorbique sur la culture de *Spirochaeta gallinarum*. Ann. inst. Pasteur, **69**, 158-161.
- MADSEN, L. L., McCay, C. M., et MAYNARD, L. A. 1935 **Synthetic diets for herbivora**. Cornell Univ. Agr. Exptl Sta. Mem. No. 178.
- MAPSON, L. W. 1942 Vitamin methods. V. A note on the determination of ascorbic acid in fruits and vegetables in the presence of SO₂. Biochem. J. (London), **36**, 196.
- MARIN, P. 1936 Scurvy due to the destruction of vitamin C by intestinal bacteria. Minerva Med., **2**, 25-29.
- ORR, J. B., et CRICHTON, A. 1924 The requirement of the pig for vitamin A and vitamin C. J. Agr. Sci., **14**, 114-125.
- PALLADINA, O. K., et ANOSHKINA, A. A. 1937 Teneur du lait en vitamine C et formation synthétique de cette vitamine pendant la fermentation lactique. Microbiologie, **6**, 787-804.
- PATOCKA, F., et ILAVSKY, J. 1939 L'acide l-ascorbique et les anaérobies. Ann. inst. Pasteur, **62**, 296-316.
- PEARSONS, H. I. 1920 J. Biol. Chem., **44**, 587.
- PEARSONS, H. I., et HUTTON, M. K. 1924 J. Biol. Chem., **59**, 97.
- RAHN, O., et HEGARTY, C. P. 1938 Proc. Soc. Exptl Biol. Med., **38**, 218.
- RAY, S. N., CHAND, K., et RAU, K. G. 1941 Vitamin C and G in cow's milk with a note on the synthesis of vitamin C in bovines. J. Dairy Research, **12**, 109-118.
- REID, M. E. 1950 Federation Proc., **9**, 368.
- SHARP, P. E. 1938 Rapid method for the quantitative determination of reduced ascorbic acid in milk. J. Dairy Sci., **21**, 85-87.
- SOMMER, H. H. 1948 *Market milk and related products*. Published by the author, Madison, Wisc.
- STEPP, et SCHRODER, H. 1935 The fate of Vitamin C in the intestinal canal. I. The effect of intestinal bacteria on vitamin C. Klin. Wochschr., **14**, 147-148.
- TAUBER, H., KLEINER, I. S., et MISHKIND, D. 1935 Ascorbic acid (vitamin C) oxidase. J. Biol. Chem., **110**, 211.
- THURSTON, L. M., PALMER, L. S., et ECKLES, C. H. 1926 The role of the antiscorbutic vitamin in the nutrition of calves. J. Dairy Sci., **9**, 37-49.
- THURSTON, L. M., PALMER, L. S., et ECKLES, C. H. 1929 Further studies of the role of vitamin C in the nutrition of calves. J. Dairy Sci., **12**, 394-404.
- WALLIS, G. C. 1943 Evidence of the synthesis of vitamin C by dairy cows. J. Dairy Sci., **26**, 401-408.
- WHITE, M., et ROBERTS, M. 1923 J. Ministry Agr. Engl., **30**, 27.
- YOUNG, R. M., et JAMES, L. H. 1942 Action of intestinal microorganisms on ascorbic acid. J. Bacteriol., **44**, 75-84.
- YOUNG, R. M., et RETTGER, L. F. 1943 Decomposition of vitamin C by bacteria. J. Bacteriol., **46**, 351-363.

INFLUENCE OF LACTIC ACID BACTERIA ON VITAMIN CONTENT OF MILK

SUMMARY

Lactic acid bacteria are of prime importance in upkeeping the health of man and animals of all types, in assuming protection of the intestines against the action of harmful microorganisms. They have essential hygienic characteristics and are often employed in therapy. Since they are used in the preparation of many foodstuffs, especially cheese and fermented milks, the study of their characteristics is most important. The object of this work was to determine the influence of the species used in the making of milk products on the different milk vitamins, namely thiamin, riboflavin, nicotinic acid, pantothenic acid and ascorbic acid.

The work consisted in cultivating lactic acid bacteria in sterilized skim milk and in determining periodically the vitamin content of these cultures by appropriate methods.

The results reveal that the lactic acid bacteria studied generally use up some of the milk vitamins during their rapid multiplication, which extends almost to the coagulation point of the milk. The milk recovers afterwards, partly or totally, the vitamins used up. Is this gain due to the bacterial synthesis or to the liberation of vitamins mobilized during the active growth? We have not solved this problem.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
AND ARCHITECTURE

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
AND ARCHITECTURE

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
AND ARCHITECTURE

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
AND ARCHITECTURE

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
AND ARCHITECTURE

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
AND ARCHITECTURE

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
AND ARCHITECTURE

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
AND ARCHITECTURE

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
AND ARCHITECTURE

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
AND ARCHITECTURE

THE UNIVERSITY OF CHICAGO
DEPARTMENT OF THE HISTORY OF ARTS
AND ARCHITECTURE

DEUXIÈME PARTIE

PROPRIÉTÉS BACTÉRIOSTATIQUE ET BACTÉRICIDE
DES LAITS FERMENTÉS

PROCEEDINGS

THE NATIONAL ASSOCIATION OF THE DEAF

AND THE DEAF-BLIND

1900

DEUXIÈME PARTIE

PROPRIÉTÉS BACTÉRIOSTATIQUE ET BACTÉRICIDE DES LAITS FERMENTÉS *

La Bible est le plus ancien document qui relate les propriétés bienfaisantes des laits fermentés ; elle nous enseigne que les peuples du Proche et du Moyen Orient connaissaient et consommaient ces laits. Les voyageurs furent les premiers à répandre les recettes de fabrication dans les pays slaves, et c'est du sud de la Russie qu'elles furent transmises aux pays de l'Europe occidentale. Les méthodes empiriques de fabrication de l'antiquité firent place, à la fin du dix-neuvième siècle, à des techniques nouvelles inspirées de la science bactériologique. Metchnikoff (1908), s'inspirant des travaux de Pasteur, reconnut le rôle des bactéries dans la fabrication du yoghourt. Il ne tarda pas à élaborer une hypothèse sur la longévité des bulgares qui consomment « le bacille de la vie », *Lactobacillus bulgaricus*.

On croit que les substances fécales et les résidus alimentaires non-digérés dans l'intestin entretiennent la croissance des microbes de putréfaction qui sécrètent des substances toxiques capables de traverser la paroi intestinale et d'envahir l'organisme. Selon la théorie de Metchnikoff, ces microbes sont remplacés par le bacille bulgare chez les personnes qui font usage du yoghourt. Cette hypothèse s'est révélée boiteuse ou incomplète à la suite des travaux de Rettger et Cheplin (1921) qui observèrent que seul *Lactobacillus acidophilus* peut remplacer partiellement la flore intestinale, et que celle-ci se rétablit inexorablement une fois les doses massives de cultures acidophiles discontinuées.

L'hypothèse de Metchnikoff eut quand même le mérite de promouvoir l'étude des laits fermentés, des flores essentielles constitutives et des changements qui s'opèrent dans le lait à la suite de la fermentation lactique (Corminboeuf, 1932). D'autre part, les observations cliniques de nature à vérifier cette hypothèse ont souvent manqué de contrôle scientifique rigide ; plusieurs

*Ce travail fut exécuté en 1956.

rapports sérieux, cependant, ont confirmé les propriétés thérapeutiques bienfaisantes des laits fermentés dans les cas de diarrhées (Fykov et Mayer, 1941), de dérangements intestinaux (Mejlbov Nygart, 1940), d'intoxication intestinale (Gonzales Galvan, 1944), d'éruclation, de flatulence (Schroeder, 1946), d'ulcères peptiques, de gastro-entérites, d'hépatites, de coliques et de dysenterie (Grenet *et al.*, 1939 ; Guillemont et Jeremac, 1939). Rosell a aussi recommandé les laits fermentés pour faciliter la digestion et l'assimilation des autres aliments ; il appuie ses recommandations sur l'observation que les produits de dégradation de la caséine stimulent les sécrétions hépatiques et intestinales, que l'acide lactique est un antiseptique et un digestif, et que l'alcool et l'anhydride carbonique aident à maintenir le tonus des nerfs intestinaux.

Ces observations et bien d'autres montrent que le rôle des laits fermentés en hygiène intestinale n'est plus à démontrer ; l'hypothèse de l'implantation des bactéries lactiques et de la désintoxication n'a pas résisté aux rigueurs de la méthode scientifique, cependant, et la cause des bons effets thérapeutiques demeure encore obscure. Au cours des dernières années, plusieurs découvertes en biochimie et en microbiologie ont fait naître l'espoir de fournir des explications plus scientifiques. Ainsi, Schultz et Werner (1942) ont observé que le kéfir s'enrichit de vitamines du complexe B ; la première partie de ce travail se consacre à vérifier cette synthèse dans les laits fermentés. Doan et Dizikes (1942) ont aussi montré que le lait de beurre se digère plus facilement que le lait naturel ; cette hypothèse est considérée dans la troisième partie. Enfin, on s'est rendu compte que certains laits fermentés sont bactéricides pour plusieurs microorganismes pathogènes (Rosell, 1932 ; Ghosh *et al.*, 1938) et sécrètent peut-être un ou plusieurs antibiotiques (Seneca *et al.*, 1950).

Ce travail a pour but de rechercher les substances inhibitrices dans le yoghourt, le lait de beurre, le lait acidophile et le kéfir. Peut-être permettra-t-il aussi d'offrir une explication supplémentaire aux bons effets des laits fermentés sur la flore intestinale et sur la prévention et le traitement de certaines maladies.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les substances inhibitrices que l'on trouve dans le lait peuvent se grouper sous trois titres principaux : les substances inhibitrices naturelles du lait frais, les substances inhibitrices que l'on rencontre accidentellement dans le lait frais, et les substances inhibitrices sécrétées par les bactéries qui croissent dans le lait.

Les substances inhibitrices naturelles du lait. On a maintes fois observé que le lait frais inhibe la croissance des microorganismes pour une durée plus ou moins longue après la traite ; McEwen et White (1950) ont étudié plusieurs facteurs qui font varier cette propriété. Lal et Joshi (1952) ont reconnu que *Escherichia coli* est très susceptible à l'action bactéricide du lait frais, tandis que *Shigella dysenteriae* est beaucoup plus résistant ; plusieurs autres bactéries pathogènes montrent des susceptibilités intermédiaires. Dans une série de

publications, Wilson et Rosenblum (1952a, 1952b) ont découvert que la lacténine, nom générique embrassant l'activité bactéricide du lait frais, exerce son action inhibitrice sur les streptocoques hémolytiques appartenant à plusieurs groupes sérologiques ; la raréfaction du milieu en oxygène ou l'addition d'agents réducteurs inhibent l'action antibiotique. Lopes (1953) observa aussi que cette action bactéricide se prolonge quelques heures après la traite, à condition que la contamination initiale du lait ne soit pas trop considérable ; l'antibiotique disparaît peu à peu à 5 C, mais augmente à 27 C.

Reprenant l'étude de la lacténine, Auclair (1954), Auclair et Berridge (1953), et Auclair et Hirsch (1953) réussirent à différencier la lacténine de la lysozyme et à résoudre la première en deux fractions, la lacténine₁ et la lacténine₂. Les deux fractions sont bactériostatiques pour *Streptococcus pyogenes* ; administrées ensemble, elles exercent une action synergétique. L'anaérobiose et les agents réducteurs inhibent leur activité d'une façon réversible, tandis que le peroxyde d'hydrogène la détruit irrémédiablement ; la pasteurisation commerciale n'exerce aucun effet. Hennington (1956), Hennington et Kosikowski (1957) expliquent le pouvoir germicide du lait frais par sa pauvreté en groupements sulfhydryles -SH ; le chauffage ou l'addition d'agents réducteurs, la cystéine en particulier, enrichissent le lait en groupements -SH et détruisent le pouvoir germicide. Tout récemment, Kirschner *et al.* (1957) ont montré que cette action bactéricide s'exerce aussi contre le genre *Leptospira*.

Les substances inhibitrices accidentelles dans le lait. Les substances inhibitrices que l'on trouve occasionnellement dans le lait frais sont les désinfectants chimiques, les sulfamidés et les antibiotiques ; on rencontre aussi des bactériophages. Les sulfamidés et les antibiotiques s'introduisent dans le lait à la suite du traitement de certaines maladies des animaux, dont la plus répandue est la mammite ; la pénicilline, la streptomycine, l'auréomycine et la terramycine sont les antibiotiques que l'on peut déceler le plus souvent. On pourrait croire que la présence d'antibiotiques dans le lait ne fait qu'améliorer sa qualité en réduisant le nombre de microorganismes. Greene et Bell (1952) ont démontré que l'auréomycine et la terramycine, à raison de 10 ppm, empêchent la croissance microbienne et le développement de l'acidité pour une période de 20 heures à 37 C ; pour exercer la même action, une concentration cent fois plus grande de sulfamidés est nécessaire. De telles concentrations d'antibiotiques font surgir de graves problèmes d'hygiène publique, et un grand nombre d'auteurs, en particulier Calbert (1951), Wilkowske et Krienke (1955), ont mis les intéressés en garde contre l'emploi irraisonné de ces substances.

En plus de constituer une menace pour le consommateur, les antibiotiques dans le lait présentent de graves inconvénients dans la préparation des démarreurs lactiques qu'on utilise, en particulier, dans la fabrication fromagère. Bien que quelques auteurs n'aient pu déceler des quantités significatives d'antibiotiques dans le lait composé de plusieurs troupeaux (Storrs et Hiett-Brown, 1954 ; Berridge, 1956b), la plupart ont reconnu leurs effets désastreux sur la préparation

des démarreurs (Watrous, 1951 ; Overby, 1952 ; Johns, 1953 ; Johns et Berzins, 1957). Hunter (1949a) et Krienke (1949, 1950) ont observé les effets de la pénicilline ; Johnstone (1950) et Angelotti (1955) ont montré respectivement que l'auréomycine et la terramycine produisent des effets inhibiteurs analogues.

On s'accorde parfaitement sur les concentrations de pénicilline qui produisent des effets inhibiteurs significatifs sur les démarreurs (Adamse, 1955 ; Scott, 1950 ; Stoltz et Hankinson, 1953 ; Timroth, 1953) : il est possible de déceler la présence de 0.005 à 0.05 unité de pénicilline par millilitre selon les espèces et les souches bactériennes. Les effets inhibiteurs se concentrent dans la fraction grasse du lait (Jago, 1954). Keogh (1956) affirme que la sensibilité à la pénicilline est indépendante de l'espèce bactérienne, mais que *Streptococcus cremoris* est extrêmement sensible à la nisine. Claybough et Nelson (1951), ainsi que Jepsen et Overby (1951), recommandent que les laits qui contiennent de la pénicilline et servent à la préparation des démarreurs soient inactivés par des produits chimiques ou par la pénicillinase ; ils préconisent aussi l'utilisation de souches résistantes ; l'extraction de la pénicilline du gras du lait est impraticable (Brøggler *et al.*, 1951).

L'action des antibiotiques sur la fabrication et la maturation des fromages n'est pas moins décevante (Hunter, 1949c ; Katznelson et Hood, 1949 ; Scott, 1951 ; Berridge, 1956c). Aussi peu que 0.01 (Thomé, 1953) à 0.1 (Whitehead et Lane, 1956) unité de pénicilline par millilitre suffit à abaisser la qualité des fromages. La pénicillinase est très efficace dans la fabrication fromagère pour rétablir la qualité du lait chargé de pénicilline (Auclair, 1952). Le fromage Edam contenant de la nisine, sécrétée par le démarreur, ne présente pas la même diminution de qualité, bien que sa maturation soit retardée (Galesloot et Pette, 1957 ; Galesloot *et al.*, 1957), et que les yeux caractéristiques ne s'y forment pas. Les antibiotiques sécrétés par les démarreurs ou par les bactéries de la maturation aident parfois à obtenir des fromages de meilleure qualité en tenant en échec les bactéries sporulantes anaérobies (Hirsch *et al.*, 1952) et les ferments butyriques (Kooy et Pette, 1952a, 1952b). Enfin, la pénicilline possède un effet inhibiteur très puissant sur les bactéries du yoghourt (Galesloot, 1956a).

La production de substances inhibitrices par les bactéries lactiques servira peut-être un jour à mieux connaître les associations microbiennes au sein des produits laitiers fermentés. Blau (1950) a montré que *Streptococcus faecalis* produit un antibiotique, résistant à la chaleur et à l'acidité, qui inhibe la croissance des bactéries butyriques. *Streptococcus lactis* arrête aussi la croissance de *Streptococcus cremoris* (Wilharm et Ciblis, 1951), *Bacillus cereus* (Garvie et Stone, 1953), *Bacillus subtilis* et *Pseudomonas fluorescens* (Moycho et Gromska, 1956). D'autre part, certaines souches de *Lactobacillus plantarum* sont capables de détruire les antibiotiques produits par *Streptococcus lactis* (Kooy, 1952).

La présence de pénicilline dans le lait peut aussi altérer la valeur des critères qui permettent de juger de la qualité sanitaire du lait. Ainsi, Hunter (1949b)

a montré qu'en présence de pénicilline le test de la réductase indique une qualité exagérée puisque la réduction est ralentie ; 0.05 à 0.5 unité de pénicilline suffisent à infirmer les résultats (Johns et Desmarais, 1953). La pénicilline peut aussi infirmer le comptage des coliformes dans le lait (Wilkowske et Krienke, 1951).

Les substances inhibitrices produites par les démarreurs. Whitehead et Riddett (1933) ont expliqué que le retard qu'on observe quelquefois dans le développement de l'acidité du lait utilisé dans la fabrication fromagère naît non pas de l'action des bactériophages, mais de la présence d'une substance inhibitrice. Mattick et Hirsch (1944) ont confirmé ces observations et isolé une substance très puissante, la nisine, qui s'accumule dans les cultures de *Streptococcus lactis* ; les souches productrices appartiennent au groupe N (Shattock, 1943). Cet antibiotique inhibe plusieurs streptocoques pathogènes, certains bacilles et clostridies, et les lactobacilles (Mattick et Hirsch, 1944) ; les staphylocoques sont peu susceptibles, tandis que les bactéries gram-négatives sont insensibles. Le concentré, partiellement purifié, est stable à la chaleur, dialysable, se tolère facilement en injection. C'est une protéine de poids moléculaire peu élevé, sans action sur la flore intestinale et sans usage médical. On doit exercer un contrôle rigide sur les conditions d'incubation afin d'obtenir les fractions désirables ; ces cultures sont stables pendant plusieurs mois. Garvie (1953) a décrit les méthodes d'isolement de cultures actives à partir du lait cru ; les cultures pures se dissocient parfois, mais il est relativement facile de réisoler les mutants producteurs (Galesloot, 1957b).

Les applications de la nisine sont nombreuses, mais se confinent ordinairement à la production des fromages. Les chercheurs anglais, de concert avec ceux de France, ont étudié sérieusement la fabrication de fromages de différents types avec des démarreurs du groupe N de *Streptococcus lactis* (McClintock *et al.*, 1952). Ces fromages se détériorent moins facilement : la nisine ne tue pas les spores de *Clostridium sporogenes* et de *C. bifermentans*, mais inhibe leur croissance ; elle est sporicide pour *C. butyricum* (Hirsch et Grinsted, 1954). Hawley (1955) a résumé, dans une revue, les applications de la nisine. Plus récemment, Galesloot (1957a) a montré que *Streptococcus cremoris* et les souches de *S. lactis* qui ne produisent pas de nisine y sont très sensibles ; les clostridies et les autres bactéries lactiques sont plus ou moins susceptibles, tandis que les entérocoques, les streptocoques qui produisent la saveur maltée, *Streptococcus faecalis* var *malodorans* et les coliformes sont insensibles. Galesloot (1956b) a aussi reconnu la production de nisinase chez les bactéries lactiques, les streptocoques en particulier ; cette enzyme annihile l'activité antibiotique de la nisine.

Activité antibiotique du yoghourt. Pette et Lolkema (1950) ont étudié les interactions des lactobacilles et des streptocoques dans le yoghourt : durant les premières heures d'incubation, la symbiose favorise *Streptococcus thermophilus* ; durant la dernière période, *Lactobacillus bulgaricus* exerce une antibiose envers le streptocoque. L'activité antibiotique du yoghourt sur les bactéries fut observée pour la première fois par Seneca *et al.* (1950) qui ont comparé la valeur antibioti-

que du yoghourt fait de lait humain et de lait de vache. Ils ont trouvé que le lait de vache accentue les qualités bactériostatique, bactéricide, trypanicide et leishmanicide du yoghourt. Par la méthode officielle de détermination de la pénicilline, ils ont observé que l'activité antibiotique grandit du début de l'incubation jusqu'au huitième jour où elle atteint son apogée ; de ce moment, l'acidité continue de croître tandis que l'activité antibiotique diminue pour s'éteindre complètement au seizième jour ; cette bifurcation des deux courbes indique que l'activité antibiotique est différente de l'action de l'acide lactique. Cependant, la neutralisation des cultures fait disparaître complètement l'action inhibitrice. Le spectre de l'antibiotique est très étendu : plusieurs bactéries et protozoaires sont susceptibles ; la substance active est diffusible, filtrable, relativement thermostable.

Méthodes de détermination des antibiotiques dans le lait. Les méthodes de détermination sont nombreuses et aussi variées que les antibiotiques que l'on est susceptible de rencontrer dans le lait et que les produits laitiers où on les recherche. Le test idéal doit être sensible, quantitatif ; il peut être spécifique si l'on recherche un antibiotique donné, ou général si l'on recherche l'activité antibiotique totale du lait. Les différentes méthodes que nous considérerons maintenant possèdent ces qualités à des degrés divers.

Treccani (1953) utilise *Lactobacillus bulgaricus* comme bactérie-test dans la détermination des antibiotiques dans le lait. *Streptococcus thermophilus* est très sensible à la pénicilline et permet d'en déceler des quantités très faibles (Berridge, 1956a). Massel *et al.* (1955) se servent de *Saccharomyces cerevisiae* comme micro-organisme-test : le lait est d'abord additionné de sucre, puisensemencé de levure ; la quantité de gaz dégagé est inversement proportionnelle à la quantité d'antibiotique.

La méthode des disques de papier, imprégnés d'antibiotiques ou de produits susceptibles d'en contenir, a fait l'objet de nombreuses études et de plusieurs modifications de la technique originale. *Bacillus subtilis* est la bactérie-test préférée à cause de sa susceptibilité à plusieurs antibiotiques (Silverman et Kosikowski, 1952 ; Gogas et Bicknell, 1953) ; la méthode est surtout efficace pour la pénicilline (Hibbs et Boyd, 1957 ; Johns et Berzins, 1956).

Galesloot et Pette (1956) ont mis au point une méthode qui utilise *Streptococcus cremoris* comme bactérie-test ; la réduction du bleu de méthylène constitue le critère ; on trace une courbe standard en mesurant le temps de réduction en regard de concentrations croissantes de nisine. La pénicilline peut se déterminer de la même façon en utilisant *Streptococcus thermophilus* comme bactérie-test ; la méthode devient très sensible (0.01 unité de pénicilline par millilitre), si l'on introduit des témoins traités à la pénicillinase (Galesloot, 1955).

Stoltz et Hankinson (1950) ont adapté le test de la phosphatase à la détermination des antibiotiques dans le lait, mais on a mis leur critère en doute (Churchill *et al.*, 1951). Nutting et Barber (1956) ont étudié la possibilité de

« marquer » les substances thérapeutiques avec des isotopes radioactifs de longue demi-vie afin de les détecter plus facilement dans le lait. Enfin, Neal (1956), Neal et Calbert (1955) préconisent l'emploi du chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium et de *Streptococcus thermophilus* dans la détermination des antibiotiques dans le lait. Le colorant devient rouge dans les cellules en croissance. La méthode est rapide et se complète en 2.5 heures ; elle est sensible à 0.04 unité de pénicilline, à 0.2 µg d'auromycine, à 0.25 µg de terramycine et à 0.4 µg de streptomycine par millilitre.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Laits fermentés. Dans des flacons de Florence de 500 ml sont distribués 350 ml de lait de vache écrémé, dans lequel on a vérifié l'absence d'antibiotique. Les flacons, bouchonnés au coton, sont stérilisés à la vapeur à 100 C pendant 20 minutes, refroidis immédiatement à la température optimum d'incubation du lait fermenté etensemencés de 2% de culture. L'incubation se prolonge jusqu'à coagulation, après quoi un lot de flacons est conservé à 4 C et un autre à 22 C. Le Tableau II-1 résume les caractéristiques des laits fermentés que nous avons étudiés. À différentes périodes d'incubation et de conservation, des échantillons sont prélevés aseptiquement pour la détermination de l'acidité totale, du pH et de l'activité antibiotique.

TABLEAU II-1

Caractéristiques des laits fermentés : composition microbienne, température d'incubation et temps de coagulation pour un inoculum de 2%

LAITS FERMENTÉS	COMPOSITION MICROBIENNE*	TEMPÉRATURE D'INCUBATION	TEMPS DE COAGULATION
YOGHOURT.....	<i>Thermobacterium yoghourtii</i> <i>Thermobacterium bulgaricum</i> <i>Streptococcus thermophilus</i>	41 C	3 heures
LAIT DE BEURRE.....	<i>Streptococcus cremoris</i> <i>Streptococcus paracitrovorus</i>	22 C	18 heures
LAIT ACIDOPHILE.....	<i>Thermobacterium acidophilum</i>	41 C	5-7 heures
KÉFIR.....	<i>Lactobacillus caucasicus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Streptococcus kefir</i> <i>Saccharomyces fragilis</i> <i>Torula kefir</i>	22 C	24 heures
NISINE.....	<i>Streptococcus lactis</i> , Gr. N**	22 C	24 heures

*Nous adoptons autant que possible la classification des bactéries du "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology". Nous avons aussi conservé des noms de genres et d'espèces de la classification de Orla-Jensen (1919) ; le "Bergey's Manual" retient ces noms dans la liste des synonymes.

Pour la classification des levures, voir Lodder et Kreger-van Rij (1952).

**Shattock et al. (1943)

Acidité et pH. Dans un bécher de 50 ml, 9 g de lait fermenté sont pesés, étendus à 20 ml environ avec de l'eau distillée et titrés au point rose, pH 8.5, de l'indicateur (5 gouttes de phénolphthaléine alcoolique à 1%) avec une solution décinormale de NaOH. Les tableaux et les figures qui suivent rapportent l'acidité totale en millilitres de solution décinormale de NaOH nécessaires à la neutralisation de l'acidité de 9 g de lait. Chaque millilitre d'alcali correspond donc à 0.1% d'acide lactique. Le pH est déterminé à l'électrode de verre.

Essai de la pénicilline. La méthode de détermination de la pénicilline est essentiellement celle du « Food and Drug Administration » présentée dans « *Tentative Methods for the Determination of Antibiotics in Milk* » (1956). Chaque jour, une solution-mère est préparée par dissolution, dans un tampon phosphaté à 1%, pH 6, d'une quantité suffisante de pénicilline en poudre (Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio) pour que la solution finale contienne 100 unités de pénicilline par millilitre. Cette solution est stérilisée sur filtre de verre fritté de porosité UF (Corning Glass Works). La solution-mère est diluée avec du lait écrémé stérile, dépourvu de pénicilline, pour obtenir des solutions contenant 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.1, 0.2 et 0.3 unité de pénicilline par millilitre. Ces solutions servent à tracer la courbe standard.

L'organisme-test, *Sarcina lutea* ATCC 9341, est entretenu par repiquages bimensuels sur le milieu A : peptone, 6 g ; casitone, 4 g ; extrait de levure, 3 g ; extrait de boeuf, 1.5 g ; glucose, 1 g ; agar, 15 g ; eau distillée, 1000 ml. Ces produits sont de Difco Laboratories, Inc., Detroit, Michigan. Le pH est 6.5 après stérilisation. Au terme de l'incubation de 24 heures à 26 C, la culture est conservée au réfrigérateur. Pour le montage des plaques, la suspension est préparée comme suit : la croissance obtenue après 24 heures d'incubation sur un tube de milieu A est lavée avec 2 ou 3 ml de bouillon nutritif ; cette suspension est étendue uniformément, à l'aide de billes de verre stériles, à la surface du milieu A solidifié dans une bouteille de Roux. Après 24 heures d'incubation à 26 C sur ce milieu, la croissance bactérienne est lavée avec 15 ml de milieu C : peptone, 5 g ; extrait de levure, 1.5 g ; extrait de boeuf, 1.5 g ; NaCl, 3.5 g ; glucose, 1 g ; K_2HPO_4 , 3.68 g ; KH_2PO_4 , 1.32 g ; eau distillée, 1000 ml. Le pH final est 7. La suspension est diluée de façon telle qu'une dilution 1:10 exhibe 10% de transmittance au spectrophotomètre Coleman, Modèle Junior 6-A. Finalement, 0.7 ml de cette suspension sont mélangés à 100 ml de milieu B liquéfié et maintenu à 48 C. La composition du milieu B est la suivante : peptone, 5 g ; extrait de levure, 3 g ; extrait de boeuf, 1.5 g ; dextrose, 1 g ; agar, 15 g ; eau distillée, 1000 ml. Le pH final est 6.6.

Les plaques sont montées en quatre étapes. La première consiste à placer 10 ml de milieu A dans chaque plaque. Cette couche est recouverte de 4 ml de milieu B,ensemencé de 0.7 ml de la suspension bactérienne ; lorsque la seconde couche est solidifiée, 6 cylindres d'acier inoxydable (S & L Metal Products Corp., 25 rue Lafayette, Brooklyn 1, N.Y.) sont déposés dans chaque plaque ; ces cylindres ont un diamètre extérieur de 8 mm ($\pm$ 0.1 mm), un diamètre intérieur

de 6 mm ($\pm$ 0.1 mm) et une hauteur de 10 mm. Dix-huit plaques sont nécessaires pour tracer la courbe standard : dans chaque plaque, trois cylindres sont remplis de la solution contenant 0.05 unité de pénicilline par ml ; les trois autres cylindres reçoivent une des autres solutions connues de pénicilline ; pour chaque solution, trois plaques sont nécessaires. Nous obtiendrons donc 54 observations de la solution contenant 0.05 unité de pénicilline par ml, 9 de chacune des autres solutions. Chaque échantillon exige aussi trois plaques : dans chaque plaque, trois cylindres sont remplis de la solution contenant 0.05 unité de pénicilline par ml, les trois autres de l'échantillon non-dilué. Toutes les plaques sont couvertes d'un couvercle de porcelaine, poli à l'extérieur, et placées à l'étuve à 26 C.

Après 16 à 18 heures d'incubation, il suffit de mesurer dans les plaques standards le diamètre des 54 zones qui bordent les cylindres remplis de la solution contenant 0.05 unité de pénicilline par ml et d'établir la moyenne. La moyenne de ces zones dans les trois plaques de chaque dilution est aussi calculée, ce qui permet d'appliquer un facteur de correction. Ensuite, les 9 zones de chaque dilution sont mesurées ; le résultat, ajouté algébriquement au facteur de correction, est le diamètre moyen corrigé des zones, à chaque concentration. Sur du papier semi-logarithmique à double cycle, le diamètre est porté en abscisses et la concentration en ordonnées (échelle logarithmique). Une ligne est tracée qui réunit tous les points.

La concentration des échantillons se trouve comme suit : les zones de la solution contenant 0.05 unité de pénicilline par ml sont mesurées et comparées à la moyenne des 54 observations de la même solution pour la courbe standard afin d'établir le facteur de correction. Ce facteur ajouté algébriquement à la moyenne des 9 zones de l'échantillon est le diamètre moyen corrigé. La concentration en unités de pénicilline par millilitre se trouve par interpolation sur la courbe standard.

Spectres bactéricide et bactériostatique. Les laits fermentés sont préparés comme d'habitude, incubés jusqu'à coagulation, conservés à 22 C pour une période totale d'incubation de 48 heures et filtrés sur papier-filtre Whatman No 2, soutenu sur entonnoir Buchner ; le sérum obtenu est limpide. L'acidité totale et le pH sont déterminés ; une fraction est conservée intacte, une autre portion est neutralisée à pH 7.5 avec une solution de NaOH à 10%. Les deux sont stérilisées par filtration sur filtre UF. Le sérum de lait naturel se prépare par acidification du lait écrémé à pH 4.75 à l'aide d'une solution d'acide lactique à 10% ; la filtration s'accomplit comme précédemment sur papier-filtre Whatman No 2 ; une portion est acidifiée à pH 4.35, une autre à pH 4.6 ; les deux portions sont stérilisées séparément sur filtre UF.

Tous les sérums obtenus sont distribués en tubes de 13 x 75 mm à raison de 3 ml par tube. Les tubes sontensemencés avec les bactéries appropriées et incubés à la température et pendant le temps convenables. L'observation de la croissance, après 24 ou 48 heures d'incubation, permet d'apprécier le pouvoir bactériostati-

que. À partir des sérums ensemencés et incubés pendant des périodes déterminées, nous avons préparé des sous-cultures dans lesquelles la croissance est observée après une période de temps appropriée ; ces observations permettent d'apprécier le pouvoir bactéricide. Le Tableau II-2 résume toutes les conditions de l'expérience.

TABLEAU II-2
*Caractéristiques des bactéries dans l'appréciation des spectres
bactériostatique et bactéricide : milieux de propagation
et d'inoculation, température d'incubation et quantité d'inoculum*

CODE	ESPÈCES BACTÉRIENNES	MILIEUX*		TEMPÉ- RATURE C	INO- CULUM
		PROPA- GATION	INOCU- LATION		
Oka B-7	<i>Streptococcus faecalis</i>	LM	AC	30	Anse**
" B-16	<i>Aerobacter aerogenes</i>	AN	AC	37	Microanse
" B-21	<i>Bacillus subtilis</i>	AN	AC	30	Anse
" B-22	<i>Escherichia coli</i>	AN	AC	37	Microanse
" B-23	"Flat Sour Organism"	AN	Pen	55	Anse (48)
" B-25	<i>Streptococcus lactis</i>	LM	AC	30	Anse
" B-30	<i>Micrococcus pyogenes</i> var <i>aureus</i>	Stock	AC	37	Microanse
" B-60	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> var <i>hominis</i> (non pathogène)	AN	AC	37	Anse (48)
" B-86	<i>Clostridium sporogenes</i>	Thio	AC	37	Anse (48)
" B-87	<i>Clostridium tetanomorphum</i>	Thio	AC	37	Anse (48)
" B-89	<i>Aerobacter cloacae</i>	AN	AC	37	Microanse
" B-95	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AN	AC	30	Microanse
" B-97	<i>Sarcina lutea</i>	Stock	AC	30	Anse
" B-132	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Veal	Pen	37	Anse (48)
" B-140	<i>Proteus vulgaris</i>	Stock	AC	30	Microanse
" B-147	<i>Micrococcus pyogenes</i> var <i>albus</i>	Stock	AC	37	Microanse
" B-150	<i>Shigella dysenteriae</i>	AN	AC	37	Microanse
" B-157	<i>Shigella paradysenteriae</i>	Stock	AC	37	Microanse
" B-158	<i>Salmonella typhi</i>	AN	AC	37	Microanse

*Signification des symboles : LM = Lait au litmus
AN = Gélose nutritive (Nutrient Agar)
Stock = Stock Culture Agar
Thio = Thioglycollate Medium avec dextrose
Veal = Veal Infusion Medium
AC = A C Broth
Pen = Penassay Broth

La Composition de ces milieux est celle du « Difco Manual ».

**L'anse a un diamètre de 4 mm, la microanse de 2 mm. À moins d'indication contraire, les lectures se font après 24 heures d'incubation.

RÉSULTATS

Activité antibiotique des laits fermentés. Les résultats sont présentés dans les Tableaux II-3 à II-7 et transposés graphiquement dans les figures II-1 à II-5 ; Dans les figures, les courbes de pH sont renversées pour mieux montrer la relation du pH à l'acidité totale et à la teneur en pénicilline. Chaque millilitre d'alcali

TABLEAU II-3
Acidité totale, pH et activité antibiotique
*(exprimée en unités de pénicilline) du Yoghourt**

ÂGE (JOURS)	ÉCHANTILLONS RÉFRIGÉRÉS**			ÉCHANTILLONS NON-RÉFRIGÉRÉS		
	ACIDITÉ***	pH	PÉNICILLINE	ACIDITÉ	pH	PÉNICILLINE
3 heures.....	8.15	4.42	.0310	8.15	4.42	.0420
1	8.30	4.38	.0305	10.80	4.08	.0480
2	8.45	4.37	.0285	12.35	4.00	.0530
3	8.60	4.36	.0315	13.45	3.94	.0590
4	8.75	4.34	.0335	14.20	3.91	.0640
5	9.05	4.31	.0345	14.60	3.89	.0565
6	9.25	4.28	.0310	14.95	3.86	.0525
7	9.55	4.24	.0290	15.05	3.84	.0500
8	9.75	4.21	.0285	15.35	3.82	.0490
9	10.10	4.17	.0285	15.55	3.80	.0490
10	10.35	4.12	.0285	15.75	3.79	.0505
11	10.65	4.08	.0310	15.85	3.78	.0540
12	10.95	4.03	.0365	16.00	3.77	.0630
13	11.15	3.99	.0430	16.15	3.77	.0715
14	11.35	3.97	.0505	16.25	3.78	.0780
15	11.50	3.95	.0595	16.40	3.79	.0665
16	11.65	3.94	.0590	16.55	3.80	.0555
20	12.10	4.05	.0540	16.60	3.80	.0520
23	12.10	4.10	.0485	16.60	3.90	.0940

*Moyenne d'au moins 10 échantillons à tous les âges.

**Après 3 heures d'incubation, des échantillons sont conservés à 4 C (réfrigérés), d'autres à 22 C (non-réfrigérés).

***Acidité exprimée en millilitres de NaOH N/10 nécessaires pour neutraliser 9 grammes d'échantillon au point rose de la phénolphthaléine.

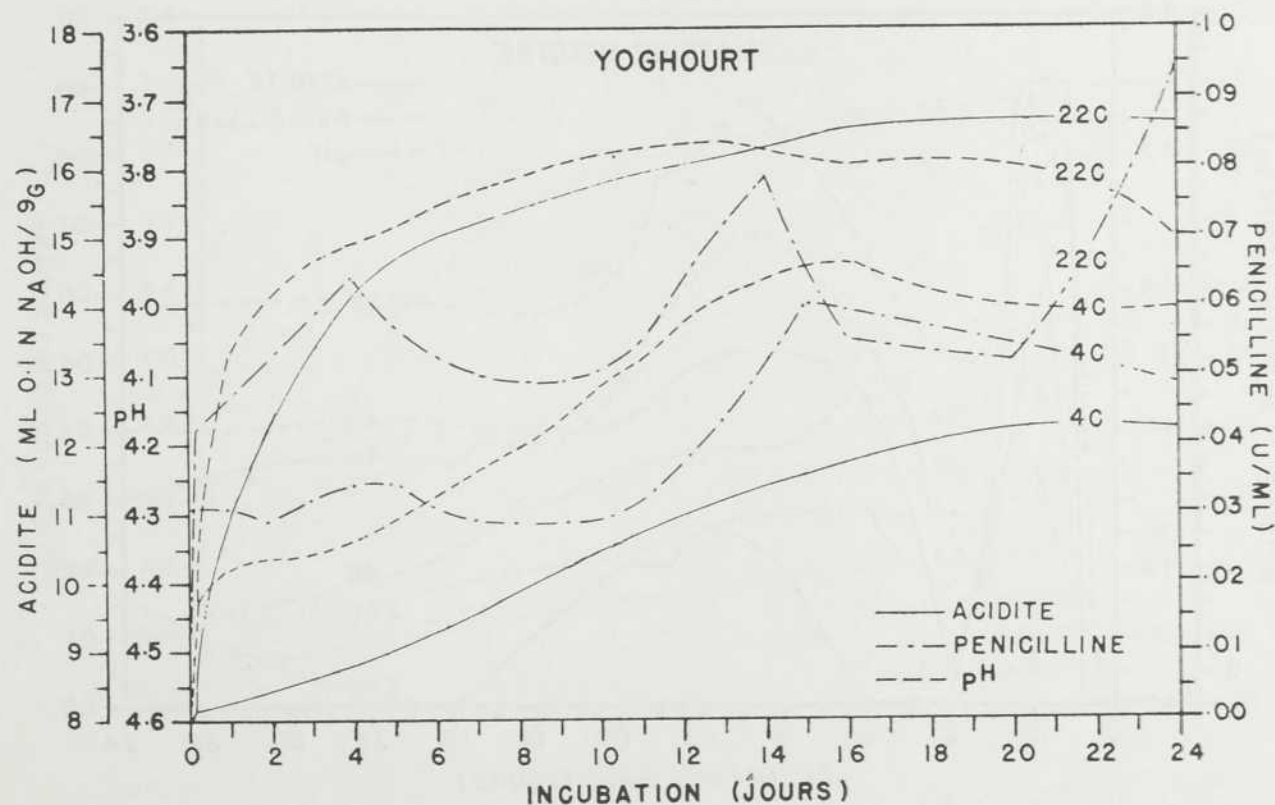


Figure II-1. Acidité, pH et activité antibiotique du Yoghourt.

TABLEAU II-4

*Acidité totale, pH et activité antibiotique
(exprimée en unités de pénicilline) du Lait de beurre**

ÂGE (JOURS)	ÉCHANTILLONS RÉFRIGÉRÉS**			ÉCHANTILLONS NON-RÉFRIGÉRÉS		
	ACIDITÉ***	pH	PÉNICILLINE	ACIDITÉ	pH	PÉNICILLINE
1	10.2	4.37	.0205	10.7	4.34	.0155
2	10.2	4.43	.0880	10.7	4.26	.0340
3	9.4	4.62	.0190	9.5	4.44	.0190
4	9.0	4.57	.0130	8.9	4.45	.0170
5	9.5	4.49	.0470	8.9	4.42	.0210
6	9.8	4.44	.0465	8.9	4.37	.0280
7	9.9	4.41	.0415	9.1	4.32	.0280
8	9.9	4.37	.0380	9.3	4.29	.0275
9	9.9	4.36	.0375	9.4	4.26	.0265
10	9.9	4.39	.0365	9.4	4.30	.0250
11	9.8	4.42	.0350	9.3	4.32	.0235
12	9.7	4.47	.0335	9.3	4.39	.0215
13	9.7	4.49	.0315	9.2	4.41	.0205
14	9.7	4.51	.0290	9.1	4.42	.0195
15	9.7	4.51	.0255	9.0	4.41	.0185
16	9.6	4.50	.0220	8.9	4.41	.0175
20	9.6	4.50	.0165	9.0	4.41	.0135
23	9.5	4.50	.0120	9.2	4.41	.0110

*Moyenne de 7 observations à tous les âges.

**Après 24 heures d'incubation, des échantillons sont conservés à 4 C (réfrigérés), d'autres à 22 C (non-réfrigérés).

***Acidité exprimée en millilitres de NaOH N/10 nécessaires pour neutraliser 9 grammes d'échantillon au point rose de la phénolphthaléine.

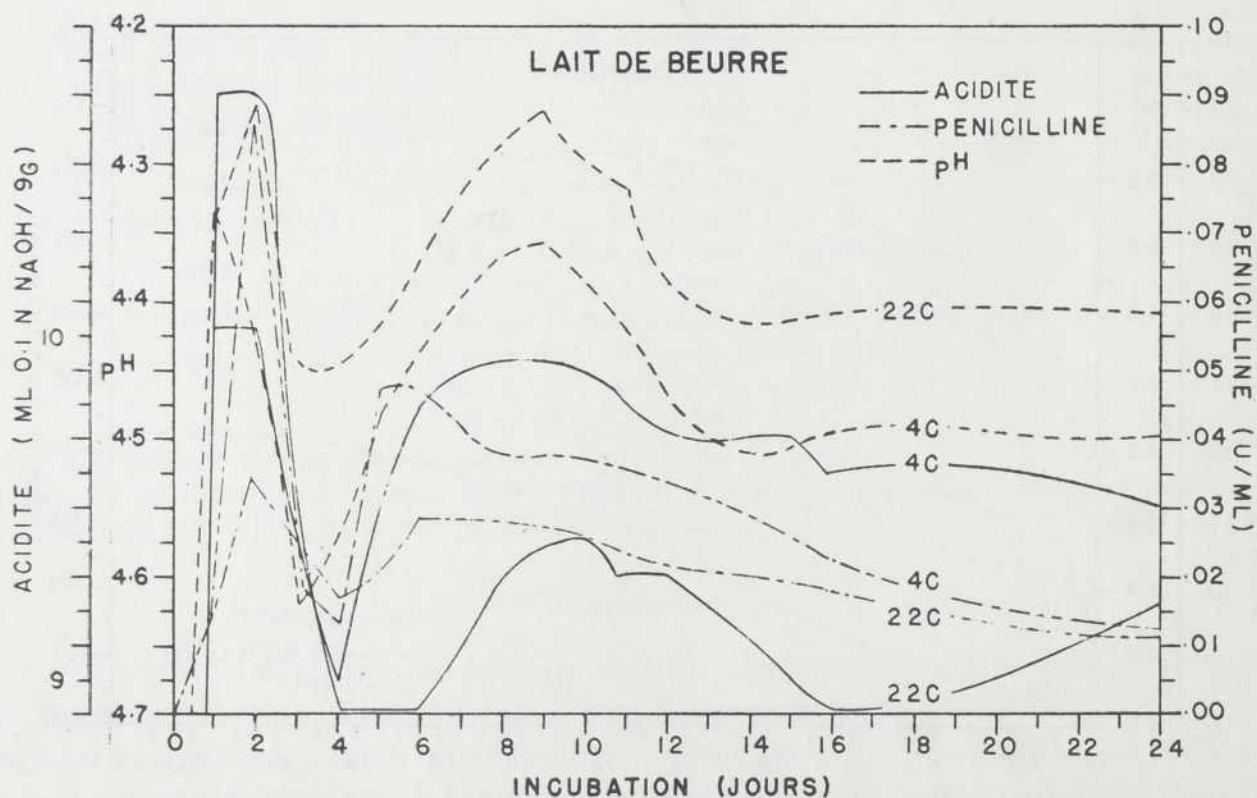


Figure II-2. Acidité, pH et activité antibiotique du Lait de Beurre.

TABLEAU II-5

*Acidité totale, pH et activité antibiotique
(exprimée en unités de pénicilline) du Lait Acidophile**

ÂGE (JOURS)	ÉCHANTILLONS RÉFRIGÉRÉS**			ÉCHANTILLONS NON-RÉFRIGÉRÉS		
	ACIDITÉ***	pH	PÉNICILLINE	ACIDITÉ	pH	PÉNICILLINE
1	5.6	5.41	.0090	6.4	5.05	.0100
2	5.7	5.34	.0095	7.6	4.70	.0169
3	5.8	5.28	.0102	8.7	4.48	.0230
4	5.9	5.20	.0110	9.9	4.32	.0284
5	6.0	5.16	.0120	10.9	4.21	.0330
6	6.1	5.11	.0128	11.5	4.14	.0368
7	6.2	5.08	.0140	11.9	4.08	.0389
8	6.3	5.03	.0152	12.3	4.05	.0408
9	6.4	5.00	.0170	12.5	4.02	.0430
10	6.5	4.96	.0191	12.7	4.00	.0455
11	6.6	4.92	.0240	12.9	3.97	.0490
12	6.7	4.90	.0290	13.1	3.95	.0530
13	6.7	4.88	.0339	13.2	3.93	.0575
14	6.8	4.87	.0341	13.3	3.90	.0635
15	6.9	4.85	.0341	13.4	3.89	.0724
16	7.0	4.81	.0340	13.5	3.89	.0840
20	7.1	4.73	.0338	13.8	3.88	.0840
23	7.1	4.68	.0330	14.1	3.86	.0840

*Moyenne de 4 échantillons à tous les âges:

**Après 7 heures d'incubation, des échantillons sont conservés à 4 C (réfrigérés), d'autres à 22 C (non-réfrigérés).

***Acidité exprimée en millilitres de NaOH N/10 nécessaires pour neutraliser 9 grammes d'échantillon au point rose de la phénolphthaléine.

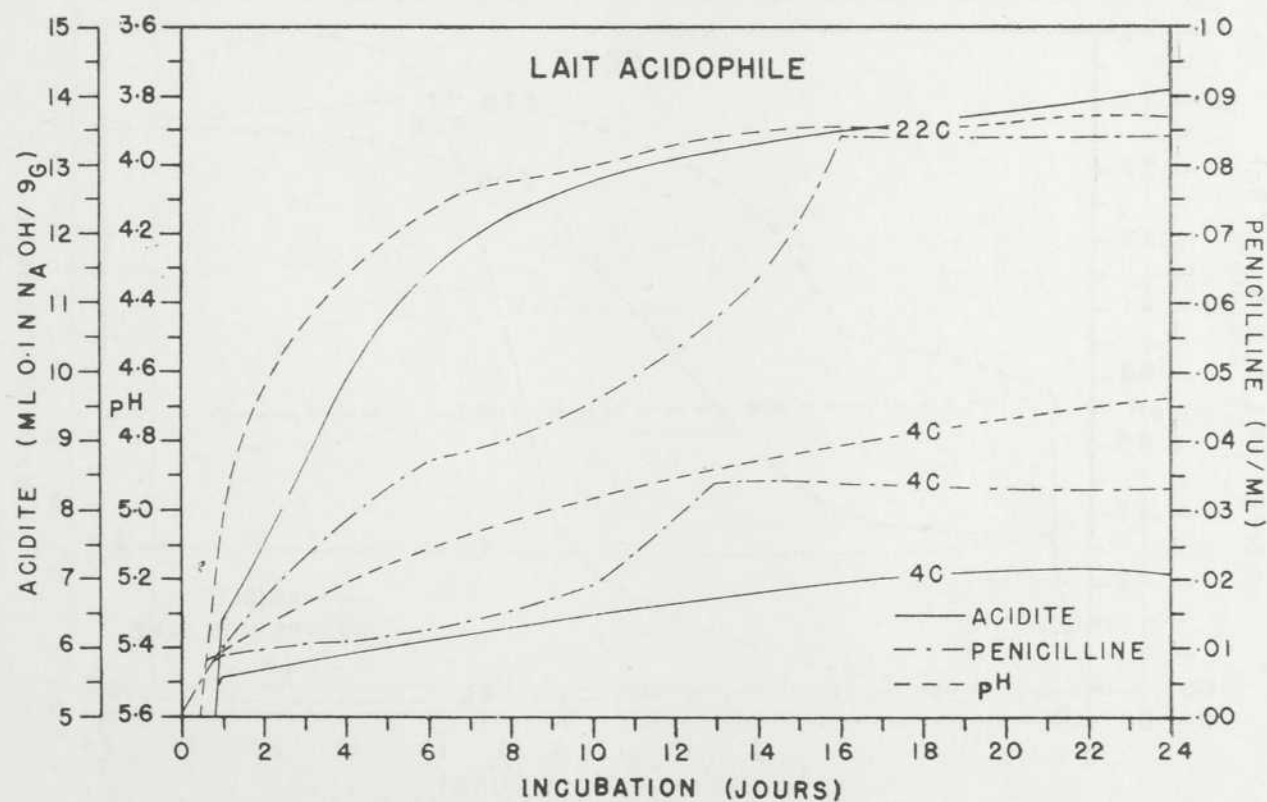


Figure II-3. Acidité, pH et activité antibiotique du Lait Acidophile.

TABLEAU II-6

*Acidité totale, pH et activité antibiotique
(exprimée en unités de pénicilline) du Kéfir**

ÂGE (JOURS)	ÉCHANTILLONS RÉFRIGÉRÉS**			ÉCHANTILLONS NON-RÉFRIGÉRÉS		
	ACIDITÉ***	pH	PÉNICILLINE	ACIDITÉ	pH	PÉNICILLINE
1	9.1	4.35	.035	9.1	4.35	.035
2	8.7	4.36	.034	9.1	4.30	.039
3	8.5	4.36	.034	9.2	4.25	.043
4	8.3	4.37	.031	9.3	4.23	.050
5	8.2	4.37	.032	9.6	4.21	.059
6	8.2	4.38	.036	10.1	4.18	.069
7	8.1	4.38	.042	11.0	4.05	.079
8	8.1	4.39	.041	12.5	3.93	.097
9	8.1	4.39	.040	14.8	3.80	.120
10	8.1	4.40	.038	17.2	3.69	.145
11	—	—	—	—	—	—
12	8.1	4.40	.030	21.6	3.59	.210
13	8.1	4.40	.026	24.0	3.56	.280
14	8.1	4.41	.025	25.3	3.52	.470
15	8.1	4.41	.024	26.3	3.51	.685
16	8.1	4.41	.022	27.0	3.50	.890
20	8.0	4.43	.022	28.0	3.55	.990
23	7.9	4.45	.022	28.1	3.61	.670

*Moyenne de 4 observations à tous les âges.

**Après 24 heures d'incubation, des échantillons sont conservés à 4 C (réfrigérés), d'autres à 22 C (non-réfrigérés).

***Acidité exprimée en millilitres de NaOH N/10 nécessaires pour neutraliser 9 grammes d'échantillon au point rose de la phénolphthaléine.

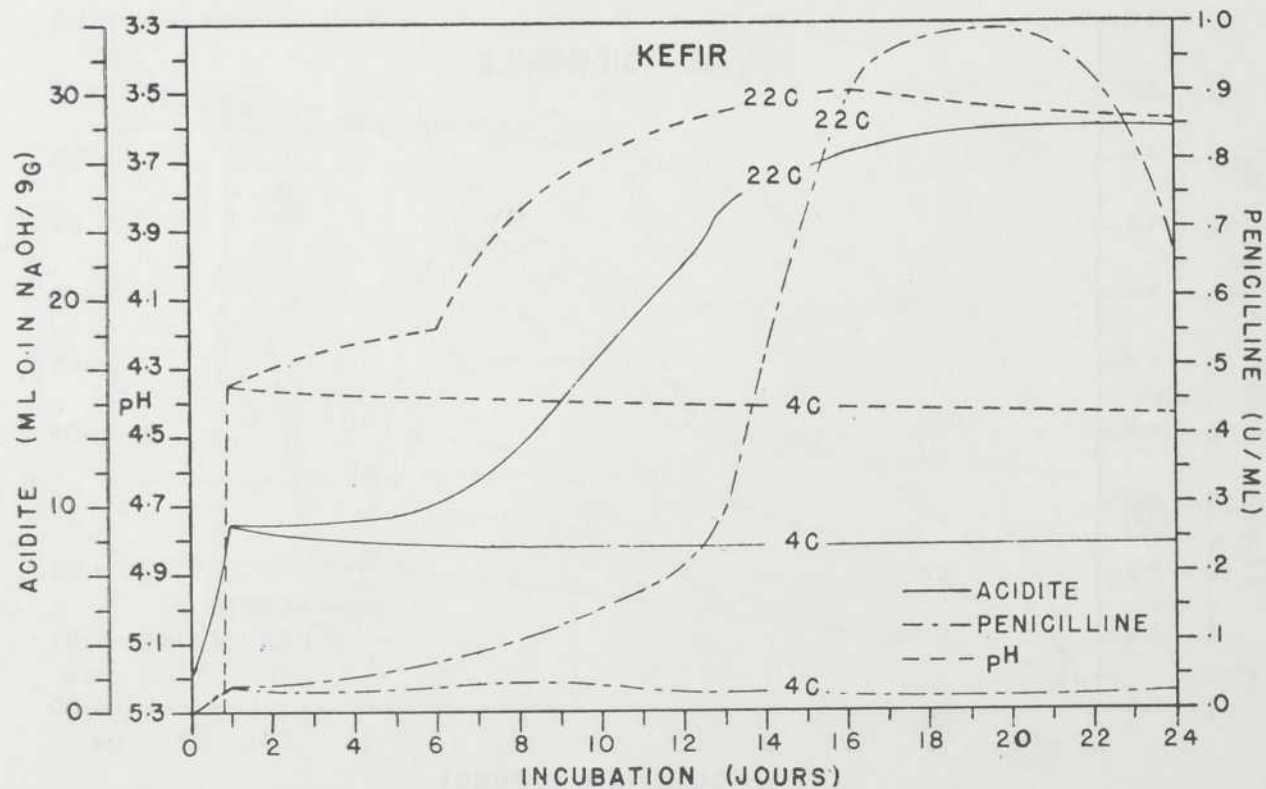


Figure II-4. Acidité, pH et activité antibiotique du Kéfir.

TABLEAU II-7
Acidité totale, pH et activité antibiotique
*(exprimée en unités de pénicilline) de la Nisine**

ÂGE (JOURS)	ÉCHANTILLONS RÉFRIGÉRÉS**			ÉCHANTILLONS NON-RÉFRIGÉRÉS		
	ACIDITÉ***	pH	PÉNICILLINE	ACIDITÉ	pH	PÉNICILLINE
1	7.65	4.35	.0320	7.85	4.30	.0320
2	7.70	4.35	.0320	8.11	4.25	.0382
3	7.74	4.38	.0318	8.40	4.21	.0392
4	7.79	4.40	.0308	8.60	4.20	.0328
5	7.83	4.42	.0301	8.74	4.22	.0310
6	7.89	4.44	.0304	8.86	4.24	.0305
7	7.95	4.46	.0314	8.90	4.26	.0341
8	7.99	4.48	.0330	8.88	4.27	.0352
9	8.04	4.51	.0328	8.80	4.28	.0350
10	7.99	4.50	.0315	8.75	4.29	.0336
11	7.94	4.48	.0300	8.72	4.29	.0330
12	7.87	4.45	.0276	8.72	4.28	.0327
13	7.84	4.42	.0264	8.76	4.27	.0325
14	7.85	4.39	.0260	8.88	4.27	.0323
15	7.88	4.40	.0265	9.00	4.26	.0322
16	7.92	4.42	.0290	9.18	4.24	.0320

*Moyenne de 4 observations à tous les âges.

**Après 24 heures d'incubation, des échantillons sont conservés à 4 C (réfrigérés), d'autres à 22 C (non-réfrigérés).

***Acidité exprimée en millilitres de NaOH N/10 nécessaires pour neutraliser 9 grammes d'échantillon au point rose de la phénolphthaléine.

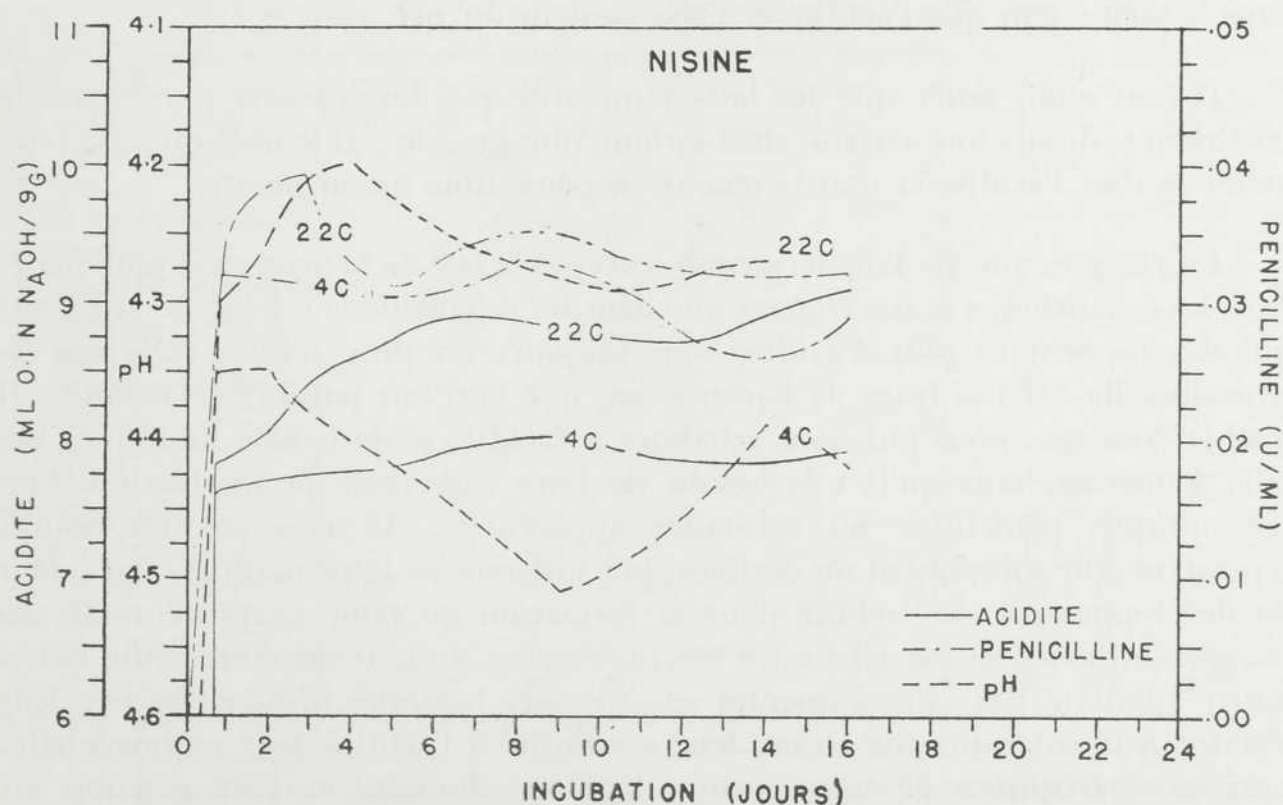


Figure II-5. Acidité, pH et activité antibiotique de la Nisine.

décinormal équivaut à 0.1% d'acide lactique. Il est aussi important de noter que toutes les figures ne sont pas à la même échelle.

Pour le yoghourt (Tableau II-3 et figure II-1), les échantillons réfrigérés se distinguent des échantillons non-réfrigérés quant au pH et à l'acidité totale. Les premiers sont moins acides et leur pH est plus élevé, comme on peut s'y attendre chez des bactéries homo-fermentatives, *i.e.* des bactéries qui produisent presque exclusivement de l'acide lactique à partir des glucides. Les courbes d'activité antibiotique suivent, avec quelques soubresauts, celles de l'acidité et du pH. Cette activité semble dépendre de l'acidité.

Le lait de beurre (Tableau II-4 et figure II-2) ne montre pas la même régularité. Les échantillons réfrigérés sont plus acides et possèdent une activité antibiotique plus prononcée. Le pH se comporte à l'inverse. Il demeure toutefois que l'activité antibiotique est plus grande pour une acidité plus grande.

Dans le lait acidophile (Tableau II-5 et figure II-3), la situation observée chez le yoghourt est idéalisée. Le pH est plus bas, l'acidité plus grande et l'activité antibiotique plus prononcée dans les échantillons non-réfrigérés. La relation de l'activité à l'acidité est parfaite.

Le kéfir (Tableau II-6 et figure II-4) se comporte comme le lait acidophile, mais à une échelle dix fois plus grande.

Pour la nisine (Tableau II-7 et figure II-5), les résultats sont moins significatifs, quoiqu'il soit toujours possible d'observer que l'activité antibiotique varie dans le même sens que l'acidité et l'abaissement du pH.

Il faut enfin noter que les laits fermentés qui développent plus d'acidité possèdent toujours une activité antibiotique plus grande. Il semble que par cette méthode c'est l'acidité et non la teneur en pénicilline qu'on mesure.

En résumé, tous les laits fermentés, excepté le lait de beurre, sont plus acides dans les échantillons non-réfrigérés que dans les échantillons réfrigérés. Les laits qui développent le plus d'acidité sont toujours les plus actifs à réprimer la croissance de *Sarcina lutea*, la bactérie-test, que l'on sait sensible à l'acidité. Il semble donc que nous puissions attribuer à l'acidité seule le rôle inhibiteur des laits fermentés, sans qu'il soit besoin de faire intervenir la production d'un antibiotique, pénicilline ou substance apparentée. Il n'est pas impossible, cependant, que soit présent un antibiotique, différent de la pénicilline, dépendant du développement de l'acidité pour sa formation ou pour l'expression de son action inhibitrice, et inactif contre *Sarcina lutea*. Nous avons donc voulu déterminer l'activité des laits fermentés sur diverses bactéries, différentes par leur réaction à la coloration de Gram, leur sensibilité à l'acidité, leur pathogénicité, leurs caractéristiques de température, leur métabolisme et leur réaction au potentiel d'oxydo-réduction.

Spectres bactéricide et bactériostatique. Dans les tableaux II-8 à II-13 est rapportée la croissance dans le sérum même (colonne S) et dans les sous-cultures de ce sérum à différentes périodes d'incubation. Le Tableau II-13 rapporte les résultats pour le sérum naturel acidifié au même pH, 4.35, que le yoghourt et au même pH, 4.6, que la nisine. Le pH des autres laits se situe entre ces extrêmes, 4.42 pour le lait de beurre, 4.35 pour le lait acidophile et 4.45 pour le kéfir. Le pH des sérums des laits fermentés neutralisés est 7.5 - 7.6. Les résultats dans la colonne S révèlent le pouvoir bactériostatique, qui se complique, cependant, de la valeur nutritive du milieu pour les diverses bactéries. L'acidité du milieu explique complètement le pouvoir bactériostatique, lorsqu'une bactérie donnée croît dans la portion neutralisée. Lorsque la bactérie n'y croît pas, il se peut que le milieu ne soit pas approprié ; il n'est alors pas possible d'alléguer une activité antibiotique.

Dans les Tableaux II-8 à II-13, nous observons le rôle de l'acidité en comparant la croissance d'une bactérie donnée dans les sous-cultures du sérum original et du sérum neutralisé. Lorsque la croissance n'est pas meilleure dans les sous-cultures du sérum neutralisé, il faut référer aux sous-cultures du sérum naturel

TABLEAU II-8

*Spectres bactéricide et bactériostatique du sérum
et du sérum neutralisé de Yoghourt*

BACTÉRIES	SÉRUM						SÉRUM NEUTRALISÉ					
	S*	1	2	4	5	24	S	1	2	4	5	24
<i>S. faecalis</i>	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+
<i>A. aerogenes</i>	—	+	+	+	—	—	—	+	+	+	+	—
<i>B. subtilis</i>	—	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—
<i>E. coli</i>	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—
"Flat Sour Organism"	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
<i>S. lactis</i>	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—
<i>M. pyogenes</i> var <i>aureus</i>	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+
<i>M. tuberculosis</i>	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
<i>C. sporogenes</i>	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
<i>C. tetanomorphum</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. cloacae</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—
<i>P. aeruginosa</i>	—	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>S. lutea</i>	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—
<i>C. diphtheriae</i>	—	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	—
<i>P. vulgaris</i>	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—
<i>M. pyogenes</i> var <i>albus</i>	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—
<i>S. dysenteriae</i>	—	+	—	—	—	—	—	+	+	+	+	—
<i>S. paradysenteriae</i> ...	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—
<i>S. typhi</i>	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—

+ = croissance

* = observation de la croissance dans le sérum même. Les chiffres représentent en heures le temps de contact des bactéries avec le sérum ; les observations se font dans les sous-cultures (Voir Tableau II-2).

acidifié au même pH que le lait fermenté considéré. Si la croissance est meilleure dans les sous-cultures du sérum naturel acidifié, un antibiotique peut être présent. Tous les tableaux indiquent qu'aucune bactérie ne croît dans du sérum de pH 4.35 à 4.6, excepté *Aerobacter aerogenes* qui pousse à pH 4.6 dans le sérum naturel.

Le sérum de yoghourt neutralisé (Tableau II-8) convient à la croissance de quelques bactéries. L'examen des sous-cultures des deux sérums révèle le rôle bactéricide de l'acidité pour plusieurs bactéries : *B. subtilis* et *S. dysenteriae* sont les plus susceptibles. En comparant ces sérums aux sérums naturels, nous observons que le pouvoir bactéricide de l'acidité ne suffit pas à expliquer tous les résultats : c'est le cas de *B. subtilis*, *E. coli*, *S. lactis*, *M. tuberculosis*, *C. sporogenes*, *C. tetanomorphum*, *S. dysenteriae* ; il se peut qu'un antibiotique soit présent.

Le Tableau II-9 indique que le sérum neutralisé de lait de beurre convient à un plus grand nombre de bactéries que celui du yoghourt, soit à cause d'éléments nutritifs plus appropriés, soit à cause d'une concentration moins élevée d'antibiotique. Le rôle de l'acidité, encore ici, est très prononcé surtout pour *B. subtilis*, *M. tuberculosis* et *S. dysenteriae*. Un antibiotique peut être présent

TABLEAU II-9

*Spectres bactéricide et bactériostatique du sérum
et du sérum neutralisé de Lait de Beurre*

BACTÉRIES	SÉRUM						SÉRUM NEUTRALISÉ					
	S*	1	2	4	5	24	S	1	2	4	5	24
<i>S. faecalis</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. aerogenes</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	—	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
"Flat Sour Organism"	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
<i>S. lactis</i>	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+
<i>M. pyogenes</i> var <i>aureus</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. tuberculosis</i>	—	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>C. sporogenes</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. tetanomorphum</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. cloacae</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>S. lutea</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>C. diphtheriae</i>	—	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>P. vulgaris</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>M. pyogenes</i> var <i>albus</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>S. dysenteriae</i>	—	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>S. paradysenteriae</i> ...	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhi</i>	—	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+

+ = croissance

* = observation de la croissance dans le sérum même. Les chiffres représentent en heures le temps de contact des bactéries avec le sérum ; les observations se font dans les sous-cultures (Voir Tableau II-2).

qui exercerait son activité sur les mêmes bactéries que celui du yoghourt, à l'exception de *S. lactis*. S'il s'agit du même antibiotique, il est moins concentré.

Le sérum neutralisé de lait acidophile (Tableau II-10) convient à toutes les bactéries, excepté *C. sporogenes*. Le rôle bactéricide de l'acidité est très net pour la plupart des bactéries, surtout *S. dysenteriae*. En comparant les résultats à ceux du Tableau II-13, nous soupçonnons la présence d'un antibiotique actif contre *B. subtilis*, *C. tetanomorphum* et *S. dysenteriae*. S'il s'agit toujours du même antibiotique, sa concentration serait encore moindre que dans le lait de beurre.

Le sérum neutralisé de kéfir (Tableau II-11) convient à presque toutes les bactéries. Le rôle bactéricide de l'acidité est général et surtout important pour *B. subtilis*, *M. tuberculosis* et *S. dysenteriae*. Il semble encore qu'un antibiotique soit présent et actif contre les mêmes bactéries que le lait de beurre ; l'inhibition est d'ailleurs de même grandeur.

TABLEAU II-10

*Spectres bactéricide et bactériostatique du sérum
et du sérum neutralisé de Lait Acidophile*

BACTÉRIES	SÉRUM						SÉRUM NEUTRALISÉ					
	S*	1	2	4	5	24	S	1	2	4	5	24
<i>S. faecalis</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. aerogenes</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
"Flat Sour Organism"	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—
<i>S. lactis</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. pyogenes</i> var <i>aureus</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. tuberculosis</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>C. sporogenes</i>	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. tetanomorphum</i> ...	—	+	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
<i>A. cloacae</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>S. lutea</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>C. diphtheriae</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>P. vulgaris</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>M. pyogenes</i> var <i>albus</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>S. dysenteriae</i>	—	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>S. paradysenteriae</i> ...	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhi</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+

+ = croissance

* = observation de la croissance dans le sérum même. Les chiffres représentent en heures le temps de contact des bactéries avec le sérum ; les observations se font dans les sous-cultures (Voir Tableau II-2).

Enfin, le Tableau II-12 montre que le sérum neutralisé de nisine est un bon milieu de culture pour toutes les bactéries, excepté les deux clostridies. L'activité antibiotique s'exerce sur *P. aeruginosa*, *S. lutea* et *S. paradysenteriae*. Il ne s'agit donc pas du tout du même antibiotique que celui dont nous soupçonnons la présence dans les autres laits fermentés.

TABLEAU II-11

*Spectres bactéricide et bactériostatique du sérum
et du sérum neutralisé de Kéfir*

BACTÉRIES	SÉRUM						SÉRUM NEUTRALISÉ					
	S*	1	2	4	5	24	S	1	2	4	5	24
<i>S. faecalis</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. aerogenes</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	—	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
"Flat Sour Organism".	—	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
<i>S. lactis</i>	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+
<i>M. pyogenes</i> var <i>aureus</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. tuberculosis</i>	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>C. sporogenes</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. tetanomorphum</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. cloacae</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>S. lutea</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>C. diphtheriae</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>P. vulgaris</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>M. pyogenes</i> var <i>albus</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>S. dysenteriae</i>	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>S. paradysenteriae</i> ...	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhi</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+

+ = croissance

* = observation de la croissance dans le sérum même. Les chiffres représentent en heures le temps de contact des bactéries avec le sérum ; les observations se font dans les sous-cultures (Voir Tableau II-2).

TABLEAU II-12
Spectres bactéricide et bactériostatique du sérum
et du sérum neutralisé de Nisine

BACTÉRIES	SÉRUM						SÉRUM NEUTRALISÉ					
	S*	1	2	4	5	24	S	1	2	4	5	24
<i>S. faecalis</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. aerogenes</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
"Flat Sour Organism"	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>S. lactis</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. pyogenes</i> var <i>aureus</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. tuberculosis</i>	—	+	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—
<i>C. sporogenes</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>C. tetanomorphum</i> ...	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>A. cloacae</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>P. aeruginosa</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>S. lutea</i>	—	+	+	—	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>C. diphtheriae</i>	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+
<i>P. vulgaris</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>M. pyogenes</i> var <i>albus</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. dysenteriae</i>	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. paradysenteriae</i> ...	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>S. typhi</i>	—	+	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+

+ = croissance

* = observation de la croissance dans le sérum même. Les chiffres représentent en heures le temps de contact des bactéries avec le sérum ; les observations se font dans les sous-cultures (Voir Tableau II-2).

TABLEAU II-13
Spectres bactéricide et bactériostatique du sérum
et du sérum neutralisé de Lait Naturel*

BACTÉRIES	SÉRUM						SÉRUM NEUTRALISÉ					
	S**	1	2	4	5	24	S	1	2	4	5	24
<i>S. faecalis</i>	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+
<i>A. aerogenes</i>	—	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+
<i>B. subtilis</i>	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+
<i>E. coli</i>	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+
"Flat Sour Organism"	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>S. lactis</i>	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+
<i>M. pyogenes</i> var <i>aureus</i>	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+
<i>M. tuberculosis</i>	—	+	+	—	—	—	—	+	+	+	—	—
<i>C. sporogenes</i>	—	+	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—
<i>C. tetanomorphum</i> ...	—	+	+	—	—	—	—	+	+	—	—	—
<i>A. cloacae</i>	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—
<i>P. aeruginosa</i>	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+
<i>S. lutea</i>	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+
<i>C. diphtheriae</i>	—	+	+	+	—	—	—	+	+	+	—	—
<i>P. vulgaris</i>	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	—
<i>M. pyogenes</i> var <i>albus</i> .	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+
<i>S. dysenteriae</i>	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+
<i>S. paradysenteriae</i>	—	+	+	+	+	—	—	+	+	+	+	+
<i>S. typhi</i>	—	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

+ = croissance

* = pH de sérum naturel : 4.35 ; pH de sérum neutralisé : 4.60.

** = observation de la croissance dans le sérum même. Les chiffres représentent en heures le temps de contact des bactéries avec le sérum ; les observations se font dans les sous-cultures (Voir Tableau II-2).

DISCUSSION

Seneca *et al.* (1950) se sont servi de la méthode officielle de dosage de la pénicilline pour reconnaître une activité bactéricide au yoghourt et pour dissocier l'action inhibitrice de l'acidité, qui se développe normalement dans ce lait, de l'activité d'un antibiotique. En effet, les courbes d'acidité et d'activité antibiotique bifurquent nettement au huitième jour alors que l'acidité continue de croître et que l'activité antibiotique s'atténue graduellement à partir de ce jour jusqu'à disparition complète, environ une semaine plus tard.

Cette méthode nous a fourni des résultats différents. Dans tous les laits fermentés étudiés, le yoghourt, le lait de beurre, le lait acidophile et le kéfir, en aucune occasion avons-nous pu dissocier l'activité antibiotique de l'acidité. Les échantillons réfrigérés sont ordinairement moins acides et moins actifs que les échantillons non-réfrigérés, et les échantillons plus acides révèlent toujours une activité antibiotique plus prononcée. Le lait acidophile et le kéfir sont des exemples typiques : les courbes d'acidité, de pH et d'activité antibiotique des échantillons réfrigérés se distinguent nettement des courbes correspondantes des échantillons non-réfrigérés. De plus, dans une même catégorie d'échantillons, l'activité antibiotique épouse étroitement la forme des courbes d'acidité et de pH. La présence d'acide lactique semble donc exprimer clairement l'activité bactériostatique, et il n'est pas besoin de faire intervenir un antibiotique pour expliquer cette activité. La bactérie-test, *Sarcina lutea*, est d'ailleurs très sensible à l'acidité.

Dans tous les laits fermentés, le rôle bactéricide de l'acidité est très grand, si grand qu'il peut obscurcir complètement celui d'un antibiotique qui serait inactivé par la neutralisation. Les spectres bactériostatique et bactéricide permettent de préciser un peu cette situation. Il est possible qu'un antibiotique, pas complètement inactivé par la neutralisation et encore actif à pH 7.5, soit présent en faibles doses. Cet antibiotique, aux concentrations observées dans les laits fermentés, serait actif contre *B. subtilis*, *E. coli*, *S. lactis*, *M. tuberculosis*, *C. sporogenes*, *C. tetanomorphum* et *S. dysenteriae*. Le yoghourt en serait le plus riche ; le lait de beurre et le kéfir viendraient en second lieu, puisqu'ils sont inactifs contre *S. lactis*. Le lait acidophile serait très pauvre, puisqu'il n'exerce d'activité qu'à l'égard de *B. subtilis*, *C. tetanomorphum* et *S. dysenteriae*. Tous les laits sont actifs contre *B. subtilis* qui pourrait alors remplacer avec avantage *S. lutea* comme bactérie-test. La streptomycine pourrait servir de standard ; nous n'avons pas encore utilisé cette méthode. Le spectre de cet antibiotique serait bien différent de celui de la nisine.

CONCLUSION

Nous avons recherché la présence d'antibiotiques dans quatre laits fermentés, le yoghourt, le lait de beurre, le lait acidophile et le kéfir.

La méthode de dosage de la pénicilline n'a permis de déceler la présence d'aucun antibiotique. Le rôle bactériostatique de l'acide lactique suffit à

expliquer tous les résultats, puisque les laits qui développent le plus d'acidité se montrent en même temps les plus actifs contre la bactérie-test, *Sarcina lutea*.

L'appréciation des spectres bactéricide et bactériostatique laisse soupçonner de faibles concentrations d'antibiotiques dans chacun de ces laits. Le yoghourt en serait le plus riche ; le lait acidophile n'en contiendrait que des traces, tandis que le lait de beurre et le kéfir occuperaient une position intermédiaire. Le spectre de cet antibiotique est différent de celui de la nisine et ressemble à celui de la streptomycine. La méthode de détermination de la streptomycine serait donc plus utile que celle de la pénicilline pour étudier le pouvoir bactériostatique des laits fermentés que nous avons étudiés.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMSE, A. D. 1955 Examination of penicillin-containing milk. *Ned. Melk Zuiveltijdschr.*, **9**, 121-138.
- ANGELOTTI, R. 1955 Studies on the physiological activities of terramycin-resistant and terramycin-susceptible cultures of cheese-ripening strains of *Streptococcus lactis*. *Dissertation Abstr.*, **15**, 1973-1974.
- AUCLAIR, J. 1952 Action inhibitrice de la pénicilline sur les lactobacilles utilisés dans la fabrication du Gruyère. *Lait*, **31**, 121-133.
- AUCLAIR, J. 1954 The inhibition of microorganisms by raw milk. III. Distribution and properties of two inhibitory substances, lactenin 1 and lactenin 2. *J. Dairy Research*, **21**, 323-336.
- AUCLAIR, J., et BERRIDGE, N. J. 1953 The inhibition of microorganisms by raw milk. II. The separation and electrophoretic examination of two different inhibitory fractions. *J. Dairy Research*, **20**, 370-374.
- AUCLAIR, J., et HIRSCH, A. 1953 The inhibition of microorganisms by raw milk. I. The occurrence of inhibitory and stimulatory phenomena. Methods of estimation. *J. Dairy Research*, **20**, 45-59.
- BERRIDGE, N. J. 1956a Penicillin in milk. I. The rapid routine assay of low concentrations of penicillin in milk. *J. Dairy Research*, **23**, 336-342.
- BERRIDGE, N. J. 1956b Penicillin in milk. II. The incidence of penicillin. *J. Dairy Research*, **23**, 342-347.
- BERRIDGE, N. J. 1956c Penicillin in milk. III. The effect of low concentrations of penicillin on the rate of acid production by starter cultures. *J. Dairy Research*, **23**, 348-354.
- BLAU, T. 1950 Bacteriostatic action of lactic acid streptococci on butyric acid bacilli. *Milchwissenschaft*, **5**, 149-153.
- BREED, R. S., MURRAY, E. G. D., et SMITH, N. R. 1957 *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7^e éd. Williams and Wilkins, Baltimore.
- BRØGGLER, H. JUNCHER, H. O., et MAGNUSSON, I. 1951 The utilization of penicillin-containing milk. *Maanedsskr. Dyrlaeger*, **62**, 217-223.
- CALBERT, H. E. 1951 The problem of antibiotics in milk. *J. Milk and Food Technol.*, **14**, 61-64.
- CHURCHILL, E. S., DRURY, A. R., LEWIS, B. D., FRANK, C. L., et BRYAN, C. S. 1951 A report on the modified phosphatase method of detecting antibiotic substances in milk. *Milk Plant Monthly*, **40**, 28-31.

- CLAYBOUGH, G. A., et NELSON, F. E. 1951 The effect of antibiotics in milk: a review. *J. Milk and Food Technol.*, **14**, 155-160.
- CORMINBOEUF, F. 1932 *Recherches biochimiques sur le yoghourt et le lait acidophile*. Institut Agricole d'Oka, La Trappe, Québec.
- DIFCO Laboratories, Inc. 1953 *Difco manual of dehydrated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures*. 9^e édition. Détroit, Michigan.
- DOAN, F. J., et DIZIKES, J. L. 1942 *Digestion characteristics of various types of milk compared with human milk*. Bull. 428. The Pennsylvania State College Press, Penn.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION 1956 *Tentative methods for the determination of antibiotics in milk*. Dr. Henry Welch, directeur, Division des Antibiotiques, Department of Health, Education and Welfare, Washington, D.C.
- FYKOV, A., et MAYER, J. 1941 Feeding of infants with Bulgarian sour milk (yoghourt) and its effects on the flora of the intestines. *Nutrition Abstr. & Rev.*, **10**, 162.
- GALESLOOT, T. E. 1955 The detection of penicillin in milk and dairy products. *Ned Melk Zuiveltijdschr.*, **9**, 158-164.
- GALESLOOT, T. E. 1956a Influence of penicillin upon the morphology of yogurt- and starter bacteria. A rapid method to establish penicillin as the probable cause of yogurt and starter failures. *Ned. Melk Zuiveltijdschr.*, **10**, 64-70.
- GALESLOOT, T. E. 1956b Lactic acid bacteria which destroy the antibioticum (nisin) of *S. lactis*. *Ned. Melk Zuiveltijdschr.*, **10**, 143-155.
- GALESLOOT, T. E. 1957a The effects of nisin upon the growth of bacteria which are concerned or possibly concerned in bacterial processes in cheese and processed cheese. *Ned. Melk Zuiveltijdschr.*, **11**, 58-73.
- GALESLOOT, T. E. 1957b Nisin production by antibiotic starters. *Ned. Melk Zuiveltijdschr.*, **11**, 74-82.
- GALESLOOT, T. E., et PETTE, J. W. 1956 The estimation of the nisin content of antibiotic starters and cultures and of cheese made by means of antibiotic starters. *Ned. Melk Zuiveltijdschr.*, **10**, 137-142.
- GALESLOOT, T. E., et PETTE, J. W. 1957 The formation of normal eyes in Edam cheese by means of nisin-producing starters. *Ned. Melk Zuiveltijdschr.*, **11**, 144-151.
- GALESLOOT, T. E., RAADVELD, C. W., et PETTE, J. W. 1957 Some preliminary experiments on the influence of nisin-producing starters upon the ripening of Edam cheese. *Ned. Melk Zuiveltijdschr.*, **11**, 152-163.
- GARVIE, Ellen I. 1953 Some group N streptococci isolated from raw milk. *J. Dairy Research*, **20**, 41-44.
- GARVIE, Ellen I., et STONE, M. Jean 1953 The associate growth of *Bacillus cereus* and *Streptococcus lactis* in milk. *J. Dairy Research*, **20**, 29-35.
- GHOSH, H., BOSE, S. K., et MUKHERJEE, S. M. 1938 Investigation on bacterial flora of dahi (yogourt) and inhibitory influence of different strains of lactic acid bacteria (isolated locally) on streptococci, staphylococci, *B. coli* and *B. typhosus*. *Calcutta Med. J.*, **33**, 296.
- GOGAS, W., et BICKNELL, A. K. 1953 The determination of penicillin in milk. *Milk Plant Monthly*, **42**, 26.
- GONZALES GALVAN, J. M. 1944 Yoghourt en la dietetica y en la terapeutica. *Med. españ.*, **12**, 598.
- GREENE, V. W., et BELL, J. M. 1952 Preserving raw milk with various antibiotic preparations. *Sci. Agr. (Ottawa)*, **32**, 619-625.
- GRENET, H., DE PFEFFEL, Mlle, ISAAC-GEORGES, P., et WIMPHEN, A. 1939 *Bull. soc. pédiatr.*, **37**, 411.

- GUILLEMONT, L., et JEREMAC, Mme 1939 Presse méd., 47, 295.
- HAWLEY, H. B. 1955 The development and use of nisin. J. Appl. Bacteriol., 18, 388-395.
- HENNINGTON, R. W. 1956 Factors affecting the germicidal property of raw milk. Dissertation Abstr., 16, 1559-1560.
- HENNINGTON, R. W., et KOSIKOWSKI, F. V. 1957 A nutritional concept of the germicidal property of raw milk. J. Dairy Sci., 40, 818-829.
- HIBBS, R. A., et BOYD, J. C. 1957 Some observations on testing milk samples for antibiotics. J. Milk and Food Technol., 20, 109-112.
- HIRSCH, A., et GRINSTED, Elizabeth 1954 Methods for the growth and enumeration of anaerobic spore-formers from cheese with observations on the effect of nisin. J. Dairy Research, 21, 101-110.
- HIRSCH, A., McCLINTOCK, Mary, et MOCQUOT, G. 1952 Observations on the influence of inhibitory substances produced by the lactobacilli of Gruyère cheese on the development of anaerobic spore-formers. J. Dairy Research, 19, 179-186.
- HUNTER, G. J. E. 1949a The effect of penicillin on lactic streptococci. J. Dairy Research, 16, 39-45.
- HUNTER, G. J. E. 1949b A note on the effect of penicillin in the reductase test for milk quality. J. Dairy Research, 16, 149-151.
- HUNTER, G. J. E. 1949c The effect of penicillin in milk on the manufacture of Cheddar cheese. J. Dairy Research, 16, 235-241.
- JAGO, G. R. 1954 Factors influencing the lactic acid-producing properties of streptococci used in the manufacture of Cheddar cheese. I. Observations relating inhibitory and stimulatory phenomena. J. Dairy Research, 21, 111-121.
- JEPSEN, A., et OVERBY, A. J. 1951 The disturbing effects of penicillin milk in the dairy industry and proposals of some technical methods for the elimination of failures. Studies on the inactivation of penicillin by means of penicillinase. Ned. Melk Zuiveltijdschr., 5, 157-185.
- JOHNS, C. K. 1953 Differences in sensitivity of lactic starters to antibiotics. J. Dairy Sci., 36, 1241-1247.
- JOHNS, C. K., et BERZINS, I. 1956 Observations on the determination of antibiotics in milk. J. Milk and Food Technol., 19, 14-17.
- JOHNS, C. K., et BERZINS, I. 1957 The role of acid in potentiating the activity of penicillin on lactic acid streptococci. Can. J. Microbiol., 3, 257-264.
- JOHNS, C. K., et DESMARAIS, J. G. 1953 The effect of residual penicillin in milk on the dye reduction tests for quality. Can. J. Agr. Sci., 33, 91-97.
- JOHNSTONE, D. B. 1950 Effect of aureomycin upon acid production by cheese starters. Bacteriol. Proc. (1950), 26.
- KATZNELSON, H., et HOOD, E. G. 1949 Influence of penicillin and other antibiotics on lactic streptococci in starter cultures used in Cheddar cheesemaking. J. Dairy Sci., 32, 961-968.
- KEOGH, Barbara P. 1956 The sensitivity of some cheese starter cultures to penicillin and nisin. Australian J. Dairy Technol., 11, 104-106.
- KIRSCHNER, L., MAGUIRE, T., et BERTRAND, W. S. 1957 Further evidence of the antileptospiral effect of milk. Electronic microscopic studies. Brit. J. Exp. Pathol., 38, 357-361.
- KOOY, J. S. 1952 Strains of *Lactobacillus plantarum* which inhibit the activity of the antibiotics produced by *Streptococcus lactis*. Ned. Melk Zuiveltijdschr., 6, 323-331.
- KOOY, J. S., et PETTE, J. W. 1952a Inhibition of the growth of lactate fermenting butyric acid bacteria by antibiotics from lactic acid streptococci. Ned. Melk Zuiveltijdschr., 6, 302-316.

- KOOY, J. S., et PETTE, J. W. 1952b The inhibition of butyric acid fermentation in cheese by using antibiotic producing streptococci as starter. *Ned. Melk Zuiveltijdschr.*, **6**, 317-322.
- KRIENKE, W. A. 1949 Penicillin in milk: a hazard to starters, buttermilk, and Cottage cheese manufacture. *Milk Dealer*, **39**, 126-129.
- KRIENKE, W. A. 1950 Penicillin in milk. *Am. Milk Rev.*, **11**, 11-12.
- LAL, Akshaibar, et JOSHI, L. K. 1952 Bacteriological studies on milk. III. Bactericidal action of milk. *Proc. Natl Acad. Sci. India*, **22**, 48-60.
- LODDER, J., et KREGER-van RIJ, N. J. W. 1952 *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Interscience Publ., Inc., New York.
- LOPES, M. X. D. 1953 Bactericidal power of milk according to grade. *Rev. militar remonta e vet.*, **12**, 111-119.
- MASSEL, D. A. A., MANDERSLOOT, J. G., et GENTIS, A. S. S. 1955 A simplified microbiological test for the detection of preservatives in milk and milk products. *Ned. Melk Zuiveltijdschr.*, **9**, 63-71.
- MATTICK, A. T. R., et HIRSCH, A. 1944 A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. *Nature*, **154**, 551.
- MEJLBOV, NYGART 1940 *Nutrition Abstr. & Rev.*, **9**, 152.
- METCHNIKOFF, E. 1908 Études sur la nature humaine. Conception optimistique de la vie. *Ann. inst. Pasteur*, **21**, 737.
- MOYCHO, W., et GROMSKA, W. 1956 Antagonistic action of *Streptococcus lactis* against *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens*, observed in milk. *Acta Microbiol. Polonica*, **5**, 267-270.
- McCLINTOCK, Mary, SERRES, Lucie, MARZOLF, J. J., HIRSCH, A., et MOCQUOT, G. 1952 Action inhibitrice des streptocoques producteurs de nisine sur le développement des sporulés anaérobies dans le fromage de Gruyère fondu. *J. Dairy Research*, **19**, 187-193.
- McEWEN, A. D., et WHITE, Marjory B. 1950 Variations in the bactericidal and bacteriostatic properties of milk. *Vet. Record*, **62**, 27-30.
- NEAL, C. E. 1956 The development of a method for the detection of starter inhibitory substances in milk and the determination of the incidence of lactic starter inhibitory substances in the milk supply of Wisconsin. *Dissertation Abstr.*, **16**, 1777.
- NEAL, C. E., et CALBERT, H. E. 1955 The use of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a test for antibiotic substances in milk. *J. Dairy Sci.*, **38**, 629-633.
- NUTTING, L. A., et BARBER, F. W. 1956 The problem of antibiotics detection in milk. *J. Milk and Food Technol.*, **19**, 162-164.
- ORLA-JENSEN, S. 1919 *The lactic acid bacteria*. Publication de l'Académie danoise des sciences, Partie 8, Série V, No 2.
- OVERBY, A. J. 1952 The effect of various antibiotics in milk following intramammary infusion. *Nord. Veterinaarmed.*, **4**, 993-1004.
- PETTE, J. W., et LOLKEMA, H. 1950 Yoghurt. I. Symbiosis and antibiosis in mixed cultures of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *Ned. Melk Zuiveltijdschr.*, **4**, 197-208.
- RETTGER, L. F., et CHEPLIN, H. A. 1921 *A treatise on the transformation of the intestinal flora with special reference to the implantation of Bacillus acidophilus*. Yale Univ. Press, New Haven, Conn.
- ROSELL, J. M. 1932 Yogurt and kefir in their relation to health and therapeutics. *Can. Med. Assoc. J.*, **26**, 341.
- ROSELL, J. M. 1933 Yoghourt milk. *Can. Public Health J.*, **24**, 344.

- SCHROEDER, K. 1946 Treatment of intestinal disturbances with bacteria in tablet form. Nord. Med., 30, 935.
- SCHULTZ, M., et WERNER, W. 1942 Zentr. Bakteriolog. Parasitenk., Abt. II, 105, 26.
- SCOTT, R. 1950 Destruction of starter activity by penicillin. Dairy Inds, 15, 1260-1262.
- SCOTT, R. 1951 Penicillin and cheesemaking. Dairy Inds, 16, 440-443.
- SENECA, H., HENDERSON, E., et COLLINS, Alice 1950 Bactericidal properties of yogurt. Am. Practitioner and Dig. Treatment, 1, 1252-1259.
- SHATTOCK, M., et MATTICK, A. T. R. 1943 J. Hyg., 43, 173.
- SILVERMAN, G. J., et KOSIKOWSKI, F. V. 1952 Systematic testing of inhibitory substances in milk. J. Milk and Food Technol., 15, 120-124.
- STOLTZ, E. J., et HANKINSON, D. J. 1950 A test for the detection of antibiotics in milk. Am. Milk Rev., 12, 60-63.
- STOLTZ, E. J., et HANKINSON, D. J. 1953 Antibiotics and lactic acid starter cultures. Appl. Microbiol., 1, 24-29.
- STORRS, F. C., et HIETT-BROWN, W. 1954 The incidence of penicillin in milk supplies. J. Dairy Research, 21, 337-341.
- THOMÉ, K. E. 1953 Effect of antibiotic residues in milk on cheese-making. Svenska Mejeritidn., 45, 13-17; 27-28.
- TIMROTH, I. von 1953 Effect of penicillin on *S. diacetylactis*. Svenska Mejeritidn., 45, 61-62.
- TRECCANI, V. 1953 A rapid method for the determination of antibiotics in milk used in cheese manufacturing. Ann. microbiol., 5, 93-97.
- WATROUS, G. H. 1951 Antibiotics and quaternaries in milk. Milk Plant Monthly, 40, 25-26.
- WHITEHEAD, H. R., et LANE, D. J. 1956 The influence of penicillin on the manufacture and ripening of cheddar cheese. J. Dairy Research, 23, 355-360.
- WHITEHEAD, H. R., et RIDDETT, W. 1933 New Zealand J. Agr., 46, 225.
- WILHARM, G., et CIBLIS, E. 1951 The importance of inhibition between *Streptococcus lactis* and *S. cremoris* in preparing new starters. Milchwissenschaft, 6, 51-53; 87-90.
- WILKOWSKE, H. H., et KRIENKE, W. A. 1951 Influence of penicillin in milk on total and coliform bacteria plate counts. J. Milk and Food Technol., 14, 92-94.
- WILKOWSKE, H. H., et KRIENKE, W. A., 1955 Inhibitory substances in milk. J. Milk and Food Technol., 18, 254-261.
- WILSON, Armine T., et ROSENBLUM, H. 1952a The antistreptococcal property of milk. I. Some characteristics of the activity of lactenin *in vitro*. The effect of lactenin on hemolytic streptococci of the several serological groups. J. Expt Med., 95, 25-38.
- WILSON, Armine T., et ROSENBLUM, H. 1952b The antistreptococcal property of milk. II. The effects of anaerobiosis, reducing agents, thiamine, and other chemicals on lactenin action. J. Exptl Med., 95, 39-50.

ANTIBIOTIC POWER OF FERMENTED MILKS

SUMMARY

For thousands of years, fermented milks have been credited with considerable hygienic and therapeutic properties. These beneficent properties were explained by the high lactic acid content of these milks. Recently, investigators of the University of Columbia, Seneca, Henderson and Collins, have reported the presence in yoghourt of an antibiotic which could differ from lactic acid and could be at least partially responsible for the hygienic value of fermented milks.

We have taken over the research work of Seneca and his associates and have sought for the presence of antibiotics in four fermented milks: yoghourt, buttermilk, acidophilus milk and kefir.

Though by the appraisal of bactericidal and bacteriostatic spectra we may infer the presence of an antibiotic in low concentration in each fermented milk, the method of determination of penicillin has not revealed the presence of any antibiotic. The bacteriostatic function of lactic acid explains by itself all the results obtained, and milks which develop the most acidity are also the most active against the assay microorganisms.

THE HISTORY OF THE UNITED STATES

OF THE

AMERICAN PEOPLE

FROM THE FIRST SETTLEMENTS TO THE PRESENT TIME

BY

JOHN F. JOHNSON

OF THE

NEW YORK PUBLIC LIBRARY

ASTOR LENOX AND TILDEN FOUNDATIONS

NEW YORK

1900

THE HISTORY OF THE UNITED STATES

OF THE

AMERICAN PEOPLE

FROM THE FIRST SETTLEMENTS TO THE PRESENT TIME

BY

JOHN F. JOHNSON

OF THE

NEW YORK PUBLIC LIBRARY

ASTOR LENOX AND TILDEN FOUNDATIONS

NEW YORK

1900

TROISIÈME PARTIE

DIGESTIBILITÉ DES LAITS FERMENTÉS

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

TROISIÈME PARTIE

DIGESTIBILITÉ DES LAITS FERMENTÉS *

L'allaitement naturel des nourrissons est de moins en moins fréquent. Les exigences de la vie moderne favorisent l'alimentation des nouveau-nés au lait de vache. Les pédiâtres s'alarment et plusieurs prêchent le retour à l'allaitement naturel. Malgré leurs protestations et les inconvénients de la maternisation du lait de vache, celle-ci se pratique de plus en plus.

Depuis déjà quelques décades, la science moderne s'est penchée sur ce problème d'importance vitale : comment modifier le lait de vache pour le rendre aussi semblable que possible au lait humain ? Les progrès dans la maternisation du lait de vache sont réels et considérables, mais la formule idéale est encore à trouver.

Le problème que fait surgir la maternisation du lait de vache est de nature bactériologique, immunologique et nutritive. Les méthodes modernes de production, de pasteurisation et de distribution du lait, de même que celles de la préparation et de la stérilisation domestiques des formules de lait, ont supprimé les accidents bactériologiques. Quant aux anticorps que le lait maternel fournit au nouveau-né, il est peu probable qu'on puisse jamais les remplacer ; cependant, la thérapeutique moderne peut suppléer au manque de résistance chez les enfants privés du lait maternel. La maternisation du lait possède aussi un aspect psychologique qu'il ne nous appartient pas de traiter.

Qualitativement, le lait de vache ne diffère pas du lait humain et on y retrouve le lactose, le gras, les protéines, les éléments minéraux, les vitamines, les enzymes et l'eau ; à cause de leur caractère extrêmement spécifique, les anticorps du lait de vache ne semblent d'aucune utilité aux autres espèces animales. La proportion des composés dans les deux laits diffèrent nettement. Le lait de vache contient plus de solides totaux et moins de lactose ; par

* Ce travail fut exécuté en 1957.

l'addition d'eau et de lactose, on parvient donc à imiter la composition du lait humain. Quelquefois, on remplace le lactose par un autre sucre, moins dispendieux ; cette substitution ne semble pas recommandable, si l'on se rappelle que le lactose est un disaccharide formé, en quantités équimoléculaires, de glucose et de galactose, et que le galactose, très rare dans les aliments autres que le lait, sert à la synthèse des sphingomyélines qui sont distribuées dans la plupart des tissus du système nerveux. On ne sait pas si les autres sucres peuvent se transformer en galactose dans l'organisme.

Même après correction, le lait de vache se distingue du lait humain. Dans l'estomac du nouveau-né, le lait humain coagule en fines particules et, ainsi, plus rapide devient l'attaque enzymatique de toute la masse du caillé. Le lait de vache produit, dans les mêmes conditions, des particules plus grossières et entraîne souvent des dérangements digestifs. Enfin, le lait humain est tamponné plus légèrement que le lait de vache ; il entretient une flore intestinale très caractéristique et constituée presque exclusivement de *Lactobacillus bifidus*, et il permet un abaissement plus considérable du pH dans la partie inférieure du tube digestif. *Lactobacillus acidophilus* remplace *Lactobacillus bifidus* chez les enfants nourris au lait de vache (Roine *et al.*, 1955).

Vers 1930, on a mis au point diverses méthodes pour mesurer la tension et la surface des caillés ; on s'en est servi pour reconnaître la valeur des différentes corrections apportées au lait de vache dans l'alimentation des enfants. Hill (1933) recommandait que seuls les laits à caillé mou servent de substituts au lait humain ; plusieurs années d'observations cliniques appuyaient ces recommandations. On s'est rendu compte, cependant, que la relation entre la digestibilité et la tension du caillé manquait de précision (Doan, 1938), ce qui stimula la recherche de nouveaux critères.

Plusieurs méthodes permettent maintenant de déterminer, avec plus ou moins de précision, la digestibilité du lait. La méthode idéale consiste à observer la digestibilité chez les enfants. Pour des raisons évidentes, cette méthode ne peut jamais s'appliquer avec toute la rigueur nécessaire. Une autre méthode consiste à expérimenter sur les rats ou les chiens et à transposer les résultats chez les humains. Comme les méthodes biologiques sont lentes, dispendieuses et souvent erratiques, on s'est tourné vers des méthodes artificielles qui consistent à soumettre le lait à l'action de la pepsine, de la trypsine, de l'acide chlorhydrique ou d'extraits de muqueuses stomacales et à mesurer soit la disparition des graisses et des protéines ou l'accumulation de leurs produits d'hydrolyse, soit la texture et les dimensions des particules de caillé. Ces méthodes artificielles doivent se calibrer sur les résultats obtenus *in vivo*. Cette revue bibliographique a pour but de rapporter les résultats fournis par ces deux groupes de méthodes.

Dans la partie expérimentale, nous avons observé, *in vitro*, la digestibilité de plusieurs laits fermentés. Les résultats indiquent que la fermentation du lait

augmente sa digestibilité et semblent offrir une explication aux effets bienfaisants que les observations cliniques révèlent chez les personnes qui s'alimentent de ces laits.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Les épreuves biologiques de digestibilité considèrent généralement les constituants du lait pris dans l'ensemble, tandis que les tests artificiels s'adressent à la dégradation d'un groupe donné de constituants et à l'accumulation de ses produits d'hydrolyse. Les protéines ont fait l'objet des plus nombreuses recherches, car elles sont plus particulièrement concernées dans la formation du caillé dont la texture et la solubilité représentent les critères de digestibilité les plus commodes.

Il ressort des études de Fraser et Powell (1950) sur la digestion tryptique que la caséine se comporte comme un mélange de deux fractions dans la proportion 4:1 ; le constituant mineur réagit avec la trypsine cinq fois plus rapidement. La trypsine libère surtout le tryptophane de la caséine, tandis que la pepsine libère surtout la tyrosine et la proline (Lembke *et al.*, 1953) ; l'action de la pepsine est plus lente et celle de la trypsine plus rapide lorsque le lait est bouilli. L'homogénéisation et l'écémage du lait n'ont aucune influence sur la vitesse d'hydrolyse par ces deux enzymes. La pancréatine hydrolyse la caséine plus lentement ; par titration à la formaldéhyde, Sasaki et Kamiya (1952) ont montré qu'après 12 heures 40% environ de la caséine apparaît sous forme de peptones et qu'après 48 heures la même quantité de caséine est dégradée en acides aminés et en peptides. Ces résultats cinétiques de la dégradation enzymatique permettront de mieux interpréter les épreuves artificielles qui ont présidé aux observations qui suivent.

L'influence de la chaleur sur la digestibilité du lait a fait l'objet de nombreuses recherches. Turner (1945) a utilisé la vitesse de digestion des protéines insolubles dans les acides comme mesure de la digestibilité d'une variété de laits. Sa méthode consiste à digérer l'échantillon 30 minutes à 37 C et à pH 4.7 en présence de pepsine et 150 minutes à 37 C et à pH 7.5 par un mélange enzymatique composé d'une partie de duodénum et de 10 parties de pancréas de porc. À différents intervalles de temps, des échantillons sont ajustés à pH 4.7, filtrés et leurs filtrats soumis à la détermination de l'azote. Parmi les différents traitements appliqués au lait, le traitement enzymatique s'est révélé le plus efficace à augmenter la digestibilité ; le lait traité au BaSO₄ est le moins digestible, tandis que les laits chauffés au-dessus de la température de pasteurisation sont plus digestibles que la moyenne ; la pasteurisation, l'écémage, l'homogénéisation et le séchage n'ont aucune influence sur la digestibilité. Melnick et Oser (1949), utilisant la titration à la formaldéhyde de Sørensen, ont trouvé que les protéines chauffées possèdent une valeur biologique plus élevée que les témoins non-chauffés à cause de la libération plus grande d'acides aminés durant la digestion enzymatique. Cependant, Sullivan *et al.* (1950) ont observé que la trypsine libère les

acides aminés plus rapidement des protéines du lait cru que du lait chauffé. Schroeder *et al.* (1953a) ont déterminé la balance d'azote chez des chiens et la digestibilité par la méthode enzymatique sur la poudre de lait et sur le même lait reconstitué après chauffage à l'autoclave. La digestibilité du lait non-reconstitué est grandement diminuée et celle du lait reconstitué sensiblement augmentée par rapport au lait non-chauffé. Schroeder *et al.* (1953b) avaient préalablement trouvé par la même méthode que l'évaporation, le séchage et le chauffage à l'autoclave à 15 psi pendant 30 minutes n'exercent pas d'influence significative sur la digestibilité. Richter et Schiller (1956) ont observé des différences considérables dans la solubilité de laits séchés par différents procédés, mais ont nié la relation entre la solubilité et la digestibilité. Mogensen et Thomasow (1953) ont observé la plus haute digestibilité pour la caséine obtenue par précipitation du lait et lavage à l'eau sans autre traitement.

Le chauffage des protéines en présence de glucides provoque la réaction connue sous le nom de réaction de Maillard. Mader *et al.* (1949) ont observé que la lactalbumine, chauffée en présence de lactose, voit sa digestibilité pour les chiens grandement diminuée. La caséine, chauffée en présence de dextrose, est aussi moins digestible pour les rats (Baldwin *et al.*, 1951). La digestibilité de la lactalbumine extraite à l'eau et mélangée aux glucides avant chauffage est aussi diminuée pour les animaux de laboratoire (Schroeder *et al.*, 1951); l'épreuve *in vitro* confirme ces résultats. Das *et al.* (1953) rapportent aussi que la caséine, chauffée en présence de glucides à l'autoclave à 121 C pendant 2 heures, est dégradée plus lentement par la pepsine et la trypsine que la caséine non-chauffée ou autoclavée en l'absence de glucides.

La tension du caillé a longtemps servi d'indice de digestibilité du lait. Hill (1933) a fait la revue des méthodes servant à la détermination de la tension et recommande le lait naturel à caillé mou dans la maternisation du lait de vache pour les enfants. Mais Doan (1938) a mis en doute la valeur de ce critère et, l'année suivante, Doan et Flora (1939), utilisant une épreuve artificielle de digestibilité, n'ont pu observer de corrélation précise entre cette propriété et la tension du caillé. Storrs (1941) a confirmé ces résultats en montrant qu'il n'existe aucune corrélation statistique significative entre la tension ou la surface du caillé et la digestibilité. Des observations cliniques sur plus de 800 enfants ont permis à Wolman *et al.* (1942) d'affirmer qu'il n'existe pas de différence dans la digestibilité du lait pasteurisé bouilli, du lait homogénéisé à différentes pressions et du lait pasteurisé soumis aux oscillations soniques; ils prétendent qu'une tension maximum est tolérable, au-dessous de laquelle aucune différence n'est décelable.

Trendtel (1954) s'appuie sur la finesse du caillé produit par le fromage de type Gervais pour le recommander dans l'alimentation des enfants, et Béhar *et al.* (1957) ont pu traiter avec succès des déficiences protéiques sévères (kwashiorkor) chez des enfants par le lait acidifié, qui produit un caillé plus finement divisé; ces auteurs ne présentent pas d'évidence que la digestibilité est meilleure.

L'homogénéisation du lait ne semble pas influencer sa digestibilité.

Doan et Dizikes (1942) ont eu les premiers cette déception. Babcock (1942) a observé que l'homogénéisation réduisait la tension du caillé mais n'augmentait pas la protéolyse totale du lait soumis à l'action peptique fortifiée de l'acidification chlorhydrique. Les produits d'hydrolyse, déterminés par la titration à la formaldéhyde, augmentent plus rapidement au début de la digestion pour le lait homogénéisé ; mais après 4 ou 5 heures de digestion, la protéolyse totale est la même que pour le lait cru. Turner (1945) a confirmé ces résultats par une méthode similaire que nous avons déjà décrite. Ilgner et Thureau (1952) ont observé que la digestion combinée à la pepsine et à la trypsine s'accomplissait plus rapidement dans le lait homogénéisé. Sager (1956) s'est servi de ses nombreux résultats d'expérience et de ceux de Ewerbeck et Jaeger (cités par Sager) pour réfuter les prétentions de ces derniers que l'homogénéisation augmente la digestibilité des protéines et du gras du lait. Cependant, le lait homogénéisé demeure moins longtemps dans l'estomac des enfants que le lait cru et requiert moins de suc gastrique pour sa digestion (Czech, 1957).

La coagulation du lait semble influencer grandement sa digestibilité. Turner (1945) reconnaît que la coagulation ou le traitement du lait sans coagulation par les enzymes augmente sa digestibilité. Chez les rats, la digestion de la caséine se fait plus rapidement lorsqu'on incorpore de la papaine. Doan et Dizikes (1942) ont trouvé que la coagulation du lait par acidification lactique, comme dans le lait de beurre, augmente considérablement sa digestibilité ; ces résultats nous ont encouragés à entreprendre ce travail sur un nombre plus grand de laits fermentés. Le lait acidifié à pH 5.7 avec de l'acide lactique, de l'acide acétique ou de l'acide formique se compare au lait acidifié par fermentation lactique naturelle (Man, 1949) ; l'acide citrique n'exerce pas les mêmes bons effets sur la digestibilité, lorsqu'on la détermine chez les porcs. Les fromages, produits par coagulation préalable du lait, ont une digestibilité diminuée (Randouin et Causeret, 1956). La coagulation après pasteurisation augmenterait la digestibilité (Randouin *et al.*, 1954). Depuis que Doan et Dizikes (1942) ont publié leurs résultats sur le lait de beurre, plusieurs auteurs hindous ont soumis des laits fermentés à l'épreuve de la digestibilité. Balasubramanian *et al.* (1955) ont trouvé que le dahi, le kheer et le chhanna sont plus digestibles que le lait bouilli témoin ; le khoa est moins digestible, ce qui confirme les résultats de Das *et al.* (1953).

L'utilisation des protéines peut être modifiée par l'addition d'autres aliments à la ration. Ainsi, Geiger (1951) a remarqué que l'addition de graisses ou de sucres retardait l'absorption de la poudre de lait entier ou écrémé, de la caséine et des hydrolysats de caséine, mais améliorait la croissance des rats. La lactalbumine subit les mêmes changements mais à un degré plus élevé. Les sirops de fruit, servis à raison de 25% d'une ration faite de lait, produisent un caillé plus fin et accélèrent l'action de la pepsine et de l'acide chlorhydrique sur les protéines du lait.

Le lait de toutes les espèces animales ne jouit pas de la même digestibilité. Turner (1945) a trouvé que le lait de chèvre est moins digestible que le lait de vache, tandis que le lait humain et le lait de jument sont plus digestibles ; ces deux derniers sont moins bien tamponnés. Le lait humain exerce une stimulation de la croissance d'autant supérieure à celle produite par le lait de vache que les enfants sont plus jeunes. Pourtant, le lait humain libère ses acides aminés et ses phospho-peptides plus lentement que le lait de vache dans l'estomac des enfants de 3 à 4 semaines, ce qui suggère que le lait humain se digère plus lentement (Mellander, 1955). La flore intestinale des enfants allaités est d'ailleurs bien différente de celle des enfants alimentés au lait de vache (Roine *et al.*, 1955). Mössmer (1955) prétend aussi que le lait de vache produit à différentes périodes de lactation montre certaines fluctuations dans sa digestibilité. Colas *et al.* (1950) ont démontré que la caséine phosphorée se dégrade dans le jéjunum où son phosphore est probablement absorbé sous forme de phospho-sérine.

Comme cette étude se limite surtout à la digestibilité des protéines, nous ne mentionnerons que quelques-unes des plus récentes observations sur la digestibilité des graisses. Koch *et al.* (1941) ont revu les méthodes de détermination de la digestibilité des graisses. Ilgner et Thureau (1952) ont observé que l'homogénéisation du lait de vache double sa vitesse de digestion pancréatique, d'après une méthode artificielle. Calloway *et al.* (1956) ont trouvé que le beurre hydrogéné est beaucoup moins digestible que le beurre non-traité ; chez les graisses naturelles, il n'existe pas de corrélation entre la digestibilité du gras d'une part, et le point de fusion, la saturation et la longueur de la chaîne carbonée d'autre part. Lloyd et Crampton (1957) ont confirmé ces résultats.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Laits. À cause du caractère artificiel de cette épreuve de digestibilité, il a fallu choisir une base uniforme de comparaison et répéter l'épreuve, à chaque expérience, sur un lait de composition stable et de digestibilité modérée. Des tests préliminaires ont permis d'arrêter notre choix sur le lait écrémé en poudre de marque « Lotemp » (Borden). Il se reconstitue en mélangeant 100 g de poudre à environ 600 ml d'eau distillée ; la suspension est tamisée sur coton pour enlever les particules non-dissoutes et complétée à 1000 ml avec de l'eau distillée. Le lait « Crino », du type Instant (Coopérative Agricole de Granby), se prépare de la même façon. Les laits frais et homogénéisés sont utilisés sans traitement. Les formules de lait maternisé apparaissent au bas du Tableau III-9.

Dans une première série d'expériences (Tableaux III-1 à III-5), nous avons essayé de saisir l'influence sur la digestibilité du « Lotemp » ou du « Crino » de l'acidification par l'acide lactique ou par la fermentation naturelle propre au yoghourt, au lait de beurre, au lait acidophile et au kéfir. Trois flacons de Florence reçoivent 300 ml de lait reconstitué ; ils sont bouchonnés au coton, stérilisés 30 minutes à 100 C et refroidis immédiatement à la température caractéristique du lait fermenté (voir Tableau II-1, Deuxième Partie). Un

flacon de lait estensemencé avec 2% de culture de lait fermenté, incubé jusqu'à coagulation et conservé 24 heures au réfrigérateur. Les deux autres flacons sont conservés dans les mêmes conditions. Le pH est déterminé avant de soumettre les laits à la digestion ; avec de l'acide lactique à 10%, un flacon de lait non-fermenté est ajusté au pH du lait fermenté ; le troisième flacon ne subit aucun traitement et sert de témoin ; cet étalon, ainsi préparé, se répète dans chacune des dix épreuves de digestibilité.

Dans une deuxième série d'expériences (Tableaux III-6 à III-8), nous avons voulu déterminer l'influence de la fermentation par les bactéries du yoghourt sur la digestibilité du lait frais, du lait homogénéisé et du lait "Crino-Instant". Pour chaque épreuve, deux flacons de "Lotemp" sont préparés : un flacon, préparé comme ci-haut, sert de lait-étalon, l'autre estensemencé de culture de yoghourt. En même temps, deux flacons du lait à l'étude subissent respectivement les mêmes traitements.

Dans une dernière série d'expériences (Tableaux III-9 et III-10), nous avons évalué l'influence du chauffage sur les mêmes laits ; encore ici, le lait-étalon est le « Lotemp » chauffé.

Digestion artificielle (modification de la méthode de Doan et Dizikes (1942)). Chaque échantillon de lait requiert quatre répétitions ; comme trois ou quatre laits sont analysés à la fois, chaque expérience se poursuit sur 12 ou 16 flacons de 125 ml. Dans chacun de 4 flacons sont pipettés 7.5 ml de solution digestive : 0.5 ml de solution normale de HCl, 2.0 ml d'extrait de rennine (Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio) à 5%, et 5.0 ml de pepsine 1:10,000 (Difco Laboratories, Inc., Detroit, Michigan) à 0.3%. Les flacons sont portés à l'incubateur à 37 C ; dans chaque flacon, sont ensuite pipettés 50 ml de lait préalablement réchauffé à 37 C ; le mélange est alors laissé à l'incubateur pendant 15 minutes ; à chaque flacon, sont ensuite ajoutés 10 ml de la solution peptique à 0.3%. Un flacon est immédiatement retiré et marque le temps zéro. L'agitateur est mis en marche et imprime aux flacons un mouvement rotatoire de 60 rpm. À chaque demi-heure, les flacons reçoivent 0.75 ml de solution normale de HCl. Après 1, 2 et 3 heures, un flacon est retiré. Les quatre flacons permettent donc d'établir l'influence du temps sur la digestibilité.

Prélèvement des échantillons. Au moment du prélèvement, chaque flacon est vidé de son contenu dans un bécher de 400 ml contenant 25 ml de formaldéhyde à 40% et 75 ml d'eau distillée ; le volume est complété à 250 ml. L'échantillon est alors conservé au réfrigérateur ; ce traitement arrête l'activité microbienne et enzymatique et durcit le caillé.

Fractionnement des échantillons. Avec précaution le contenu de chaque bécher est versé sur le tamis supérieur d'une batterie de 4 tamis télescopiques arrangés de haut en bas dans l'ordre suivant : tamis de 4 mailles/pouce, tamis de 10 mailles/pouce, tamis de 20 mailles/pouce et tamis de 40 mailles/pouce. Cette batterie est montée sur un entonnoir Buchner supportant un papier-filtre Whatman No 3 ; le flacon destiné à recevoir le filtrat est relié par sa

branche latérale à la pompe à vide et sert à recueillir la fraction soluble. Après que le contenu du flacon a été vidé sur le tamis de 4 mailles/pouce, le caillé est lavé sur ce tamis avec de l'eau distillée pour que soient entraînées vers le tamis inférieur les fines particules qui adhèrent aux gros caillots; le tamis est retiré et le caillé qu'il retient porté dans un flacon Kjeldahl. L'opération est répétée pour les trois autres tamis. Quand le papier-filtre est suffisamment sec, il est retiré de l'entonnoir et placé dans un autre flacon Kjeldahl. Le filtrat est complété à 500 ml avec de l'eau distillée et une aliquote de 50 ml est prélevée et portée elle aussi dans un flacon Kjeldahl.

Détermination de l'azote. Lorsque toutes les fractions ont été recueillies dans des flacons Kjeldahl de 500 ml, chacun reçoit 15 g de K_2SO_4 et 1.5 g de $CuSO_4$ comme catalyseur; avec précaution, 25 à 28 ml de H_2SO_4 concentré sont ajoutés, de même que quelques billes de verre. Les flacons sont chauffés doucement 5 à 10 minutes, puis jusqu'à ébullition. Lorsque la solution est limpide, le chauffage se continue pendant 30 minutes. Les flacons sont refroidis et reçoivent, avant cristallisation de leur contenu, 200 ml d'eau distillée. À chaque flacon ainsi digéré, 75 ml de solution 13 N NaOH sont ajoutés le long de la paroi. Environ 1 g de poussière de zinc est aussi ajouté, et l'alcalinité est vérifiée au papier de tournesol. Le flacon est relié au condenseur de l'appareil Kjeldahl et la distillation se prolonge 30 minutes après que l'autre bout du condenseur a été relié à un flacon Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml d'acide borique à 2%. La distillation terminée, le condenseur est lavé avec quelques gouttes d'eau distillée, et le distillat reçoit 1 ml de vert de brome-crésol à 0.1%. La titration se fait au point intermédiaire vert de l'indicateur avec une solution décimale de H_2SO_4 . Pour trouver le nombre de milligrammes d'azote dans chaque flacon, il suffit de multiplier le nombre de millilitres du titrant par sa normalité et par le nombre 14 (poids atomique de l'azote). Les quantités d'azote des six fractions sont additionnées, et le pourcentage d'azote que chaque fraction contient est calculé. Ces pourcentages sont rapportés dans les tableaux.

RÉSULTATS

Les Tableaux III-1 à III-10 rapportent la distribution de l'azote des caillés dans les six fractions. Les particules de caillé sont plus fines dans les colonnes de droite, et la dernière colonne indique la fraction d'azote soluble, la plus digestible. Dans les cinq colonnes de gauche, l'azote est emprisonné dans des particules dont les dimensions croissent à mesure qu'on lit vers la gauche. Ces épreuves de digestibilité n'ont qu'une valeur relative, puisque nous ne connaissons pas la différence absolue qui existe entre chaque fraction. Doan et Dizikes (1942) affirment, cependant, que cette épreuve *in vitro* est valide et donne à peu près les mêmes résultats que la méthode *in vivo* qui utilise le rat. Cette méthode artificielle sert aussi très bien le but de ces expériences qui est de saisir l'influence sur la digestibilité des divers traitements appliqués au lait. Sa valeur de comparaison est donc indéniable.

TABLEAU III-1

Digestibilité relative du lait écrémé « Lotemp ».
Influence de la fermentation par les bactéries du Yoghourt
et de l'acidification à l'acide lactique

TRAITEMENT	DIGESTION (HEURES)	POURCENTAGE D'AZOTE TOTAL DANS CHAQUE FRACTION					
		4M/*	10M/	20M/	40M/	PAPIER*	FILTRAT
AUCUN pH 6.62	0	0	0	24.14	34.96	18.24	22.66
	1	7.13	2.16	13.72	16.08	18.97	41.94
	2	4.48	2.16	6.00	7.08	21.31	58.97
	3	0	4.62	3.49	4.28	21.31	66.30
ACIDE LACTIQUE pH 4.24	0	0	0	1.37	25.07	43.38	30.18
	1	0	0	1.71	19.71	31.86	46.73
	2	0	0	0	4.75	23.67	71.58
	3	0	0	0	0	19.05	80.95
YOGHOURT pH 4.24	0	0	0	0	0.72	72.83	26.45
	1	0	0	0	0.61	49.50	49.89
	2	0	0	0	0.49	38.48	61.02
	3	0	0	0	0	32.58	67.42

* m/ = mailles au pouce.

Papier = papier Whatman No 3.

TABLEAU III-2

Digestibilité relative du lait écrémé « Crino-Instant ».
Influence de la fermentation par les bactéries du Yoghourt
et de l'acidification à l'acide lactique

TRAITEMENT	DIGESTION (HEURES)	POURCENTAGE D'AZOTE TOTAL DANS CHAQUE FRACTION					
		4M/*	10M/	20M/	40M/	PAPIER*	FILTRAT
AUCUN pH 6.48	0	0	0	0	41.09	36.56	22.35
	1	3.95	3.39	4.11	9.59	37.89	41.07
	2	0	3.55	3.42	4.07	26.54	62.42
	3	0	5.27	2.23	2.93	24.97	64.60
ACIDE LACTIQUE pH 4.26	0	0	0	0	0	69.58	30.42
	1	0	0	0	0	46.41	53.59
	2	0	0	0	0	32.02	67.98
	3	0	0	0	0	25.34	74.66
YOGHOURT pH 4.26	0	0	0	0.28	30.44	43.91	25.37
	1	0	0	10.98	0.24	45.11	43.67
	2	0	0	0	0.26	38.72	61.02
	3	0	0	0	0.06	33.08	66.87

* m/ = mailles au pouce.

Papier = papier Whatman No 3.

TABLEAU III-3

Digestibilité relative du lait écrémé « Lotemp ».
Influence de la fermentation par les bactéries du Lait de Beurre
et de l'acidification à l'acide lactique.

TRAITEMENT	DIGESTION (HEURES)	POURCENTAGE D'AZOTE TOTAL DANS CHAQUE FRACTION					
		4M/*	10M/	20M/	40M/	PAPIER*	FILTRAT
AUCUN pH 6.79	0	0	0.11	13.48	14.91	45.07	26.42
	1	0	5.01	13.37	15.17	23.45	43.00
	2	0	1.82	5.19	7.07	24.59	61.33
	3	0	2.78	1.43	2.09	27.17	66.54
ACIDE LACTIQUE pH 4.54	0	0	0	0	0.27	70.94	28.79
	1	0	0	0	0.35	45.05	54.60
	2	0	0	0	0.18	36.05	63.77
	3	0	0	0	0	25.38	74.62
LAIT DE BEURRE pH 4.54	0	0	0	0.24	0.66	72.29	26.82
	1	0	0	0.17	0.34	51.85	47.65
	2	0	0	0	1.74	37.58	60.67
	3	0	0	0	0.29	30.07	69.65

* m/ = mailles au pouce.

Papier = papier Whatman No 3.

TABLEAU III-4

Digestibilité relative du lait écrémé « Lotemp ».
Influence de la fermentation par les organismes du Kéfir
et de l'acidification à l'acide lactique

TRAITEMENT	DIGESTION (HEURES)	POURCENTAGE D'AZOTE TOTAL DANS CHAQUE FRACTION					
		4M/*	10M/	20M/	40M/	PAPIER*	FILTRAT
AUCUN pH 6.74	0	0	0	0.32	32.32	42.81	24.55
	1	4.94	1.60	5.25	13.38	36.51	38.33
	2	0	4.08	3.34	7.26	27.33	58.00
	3	2.34	1.33	3.77	5.84	21.44	65.29
ACIDE LACTIQUE pH 4.61	0	0	0	3.91	27.69	41.78	26.62
	1	0	0	0.55	13.10	41.45	44.90
	2	0	0	0.37	9.33	30.84	59.46
	3	0	0	0	0.54	24.55	74.90
KÉFIR pH 4.61	0	0	0	0.40	1.71	69.71	28.18
	1	0	0.78	1.12	1.62	48.46	48.02
	2	0	0.69	1.53	0.92	33.92	62.93
	3	0	0.34	0.74	0.51	31.21	67.20

* m/ = mailles au pouce.

Papier = papier Whatman No 3.

TABLEAU III-5

Digestibilité relative du lait écrémé « Lotemp ».
Influence de la fermentation par les bactéries du Lait Acidophile
et de l'acidification à l'acide lactique

TRAITEMENT	DIGESTION (HEURES)	POURCENTAGE D'AZOTE TOTAL DANS CHAQUE FRACTION					
		4M/*	10M/	20M/	40M/	PAPIER*	FILTRAT
AUCUN pH 6.70	0	0	0	1.02	38.02	38.94	22.02
	1	8.04	4.90	5.33	12.70	29.49	39.55
	2	3.81	4.70	3.44	4.54	26.87	56.64
	3	1.50	3.56	2.22	2.79	24.58	65.35
ACIDE LACTIQUE pH 5.05	0	0	0	14.17	34.17	28.62	23.05
	1	0	0	0.80	12.58	32.39	54.24
	2	0	0	0.74	7.87	30.76	60.63
	3	0	0	0.36	5.58	24.93	69.14
LAIT ACIDOPHI- LE pH 5.05	0	0	0	0	9.07	61.79	29.14
	1	0	0	0	0.48	48.31	51.21
	2	0	0	0	0	38.73	61.27
	3	0	0	0	0	30.14	69.86

* m/ = mailles au pouce.
 Papier = papier Whatman No 3.

TABLEAU III-6

Influence de la fermentation par les bactéries du Yoghourt
sur la digestibilité relative du « Lotemp » et du lait frais

TRAITEMENT	DIGESTION (HEURES)	POURCENTAGE D'AZOTE TOTAL DANS CHAQUE FRACTION					
		4M/*	10M/	20M/	40M/	PAPIER*	FILTRAT
LOTEMP Aucun traitement pH 6.66	0	0	0.61	0.39	15.48	56.44	27.09
	1	0	0.60	9.28	17.16	32.25	40.72
	2	1.77	3.68	2.80	9.41	26.94	55.39
	3	0	1.08	1.72	3.50	26.43	67.28
YOGHOURT fait de Lotemp pH 4.25	0	0	0	0.31	7.47	68.94	23.28
	1	0	0	0.25	0.51	47.84	51.40
	2	0	0	0	0.51	38.22	61.27
	3	0	0	0	0.26	25.82	73.93
LAIT FRAIS Aucun traitement pH 6.80	0	1.12	45.52	19.18	5.56	9.64	18.97
	1	11.59	26.88	11.56	5.36	10.06	34.54
	2	9.09	19.40	8.75	4.48	10.21	49.07
	3	4.05	11.36	5.91	2.67	10.74	65.52
YOGHOURT fait de lait frais pH 4.15	0	0	0	0.47	1.27	70.89	27.37
	1	0	0	0.40	0.79	40.15	58.67
	2	0	0	0.27	0.37	24.38	74.97
	3	0.70	0.17	0.28	0.14	16.21	82.50

* m/ = mailles au pouce.
 Papier = papier Whatman No 3.

TABLEAU III-7

*Influence de la fermentation par les bactéries du Yoghourt
sur la digestibilité relative du « Lotemp » et du lait homogénéisé*

TRAITEMENT	DIGESTION (HEURES)	POURCENTAGE D'AZOTE TOTAL DANS CHAQUE FRACTION					
		4M/*	10M/	20M/	40M/	PAPIER*	FILTRAT
LOTEMP	0	0	0	5.55	33.32	38.47	22.65
Aucun	1	3.84	4.59	11.56	16.28	23.82	39.92
traitement	2	0	2.90	9.23	8.70	21.94	57.23
pH 6.64	3	1.06	2.94	4.63	4.85	20.82	65.69
YOGHOURT	0	0	0.46	0.22	0.43	72.49	26.41
fait de	1	0	0	0.16	0.22	48.60	51.01
Lotemp	2	0	0	0	0.27	37.80	61.93
pH 4.23	3	0	0	0	0.17	30.45	69.38
LAIT HO-	0	0	0	22.78	28.26	27.17	21.78
MOGÉNÉISÉ	1	0	4.60	14.83	22.98	13.86	43.72
aucun traite-	2	0	4.88	9.60	9.34	20.68	55.51
ment pH 6.78	3	0	1.16	1.57	3.43	26.44	67.40
YOGHOURT	0	0	0	0.72	0.46	70.87	27.96
fait de lait	1	0	0	0.17	0.36	44.57	54.90
homogénéisé	2	0	0	0	0.26	32.27	67.47
pH 4.12	3	0	0	0	0.17	22.44	77.39

* m/ = mailles au pouce.

Papier = papier Whatman No 3.

TABLEAU III-8

*Influence de la fermentation par les bactéries du Yoghourt
sur la digestibilité relative du « Lotemp » et du lait « Crino-Instant »*

TRAITEMENT	DIGESTION (HEURES)	POURCENTAGE D'AZOTE TOTAL DANS CHAQUE FRACTION					
		4M/*	10M/	20M/	40M/	PAPIER*	FILTRAT
LOTEMP	0	0	0	1.39	28.45	45.38	24.78
Aucun	1	2.08	4.43	1.75	5.41	43.99	42.35
traitement	2	1.10	8.90	2.47	1.37	28.23	57.94
pH 6.64	3	0.55	1.71	1.41	3.20	26.29	66.83
YOGHOURT	0	0	0	0.45	0.81	70.94	27.79
fait de	1	0	0	0.17	0.63	51.80	47.39
Lotemp	2	0	0	0.23	0.34	37.67	61.75
pH 4.25	3	0	0	0	0.24	29.20	70.57
« CRINO-	0	0	0	0.49	13.99	60.97	24.55
INSTANT »	1	1.07	6.85	1.71	1.04	44.03	45.29
Aucun traite-	2	0.67	4.04	2.39	1.22	30.78	60.89
ment pH 6.48	3	3.18	4.49	1.83	0.98	24.09	65.42
YOGHOURT	0	0	0	0.16	0.44	75.93	23.47
fait de lait	1	0	0.19	0.16	0.26	46.98	52.41
«Crino-Ins-	2	0	0	0.19	0.25	36.75	62.81
tant» pH 4.26	3	0.23	0.16	0	0.16	30.49	68.97

* m/ = mailles au pouce.

Papier = papier Whatman No 3.

TABLEAU III-9

*Digestibilité relative du lait « Lotemp », chauffé
et non-chauffé, et des Formules I et II de lait maternisé*

TRAITEMENT	DIGESTION (HEURES)	POURCENTAGE D'AZOTE TOTAL DANS CHAQUE FRACTION					
		4M/*	10M/	20M/	40M/	PAPIER*	FILTRAT
LOTEMP (chauffé) pH 6.57	0	0	0	3.92	29.36	43.68	23.05
	1	0.52	4.13	6.35	16.11	30.44	42.45
	2	0	2.29	8.82	8.82	21.31	58.77
	3	0	3.28	4.33	4.59	21.95	65.85
LOTEMP NON- CHAUFFÉ pH 6.57	0	63.62	4.66	2.36	0.95	1.18	27.23
	1	45.92	9.09	5.71	3.94	4.75	30.58
	2	7.64	13.71	7.06	3.70	13.51	54.38
	3	12.25	6.43	3.93	1.72	8.84	66.84
FORMULE I** pH 6.60	0	0	0	5.12	40.20	29.81	24.87
	1	0	1.34	8.93	13.24	27.14	49.35
	2	0	1.79	4.42	5.44	27.75	60.61
	3	0	1.09	1.05	0.65	10.54	86.67
FORMULE II** pH 6.60	0	0	0	2.12	29.86	44.22	23.81
	1	0	2.24	2.01	11.25	33.46	51.04
	2	0	1.56	2.90	4.69	29.88	60.98
	3	0	0.49	0.77	0.46	22.87	75.41

* m/ = mailles au pouce.

Papier = papier Whatman No 3.

**Formule I: 28.35 g de Dextri-maltose No 1 dissous dans 900 ml de lait homogénéisé et 150 ml d'eau.

**Formule II: 28.35 g de lactose dissous dans 900 ml de lait homogénéisé et 150 ml d'eau.

TABLEAU III-10

*Digestibilité relative du lait « Lotemp » chauffé, ainsi que
des laits frais, homogénéisé et « Instant-Crino » non-chauffés*

TRAITEMENT	DIGESTION (HEURES)	POURCENTAGE D'AZOTE TOTAL DANS CHAQUE FRACTION					
		4M/*	10M/	20M/	40M/	PAPIER*	FILTRAT
LOTEMP (chauffé) pH 6.59	0	0	2.24	28.93	23.20	18.79	26.84
	1	9.79	8.66	11.33	11.95	19.15	39.12
	2	2.49	7.64	6.09	6.75	22.25	54.79
	3	4.49	4.25	3.44	2.50	23.43	61.88
LAIT FRAIS NON- CHAUFFÉ pH 6.68	0	70.34	1.24	0.88	0.66	1.27	25.61
	1	36.16	10.30	3.92	2.37	9.35	37.90
	2	30.96	5.98	12.61	4.46	2.97	43.02
	3	5.82	12.65	7.54	2.40	7.79	63.81
LAIT HO- MOGÉNÉISÉ non-chauffé pH 6.72	0	44.80	12.12	6.91	3.33	3.96	28.89
	1	11.42	14.06	9.58	5.77	12.50	46.69
	2	7.59	12.50	5.75	2.71	18.28	53.17
	3	0	7.38	4.32	2.82	21.65	63.83
«INSTANT- CRINO» non-chauffé pH 6.60	0	0	21.25	34.83	12.50	12.10	19.32
	1	3.80	5.85	4.53	8.81	37.48	39.53
	2	1.65	5.63	2.35	2.08	30.18	58.10
	3	0.85	2.90	1.59	1.59	29.56	63.51

* m/ = mailles au pouce.

Papier = papier Whatman No 3.

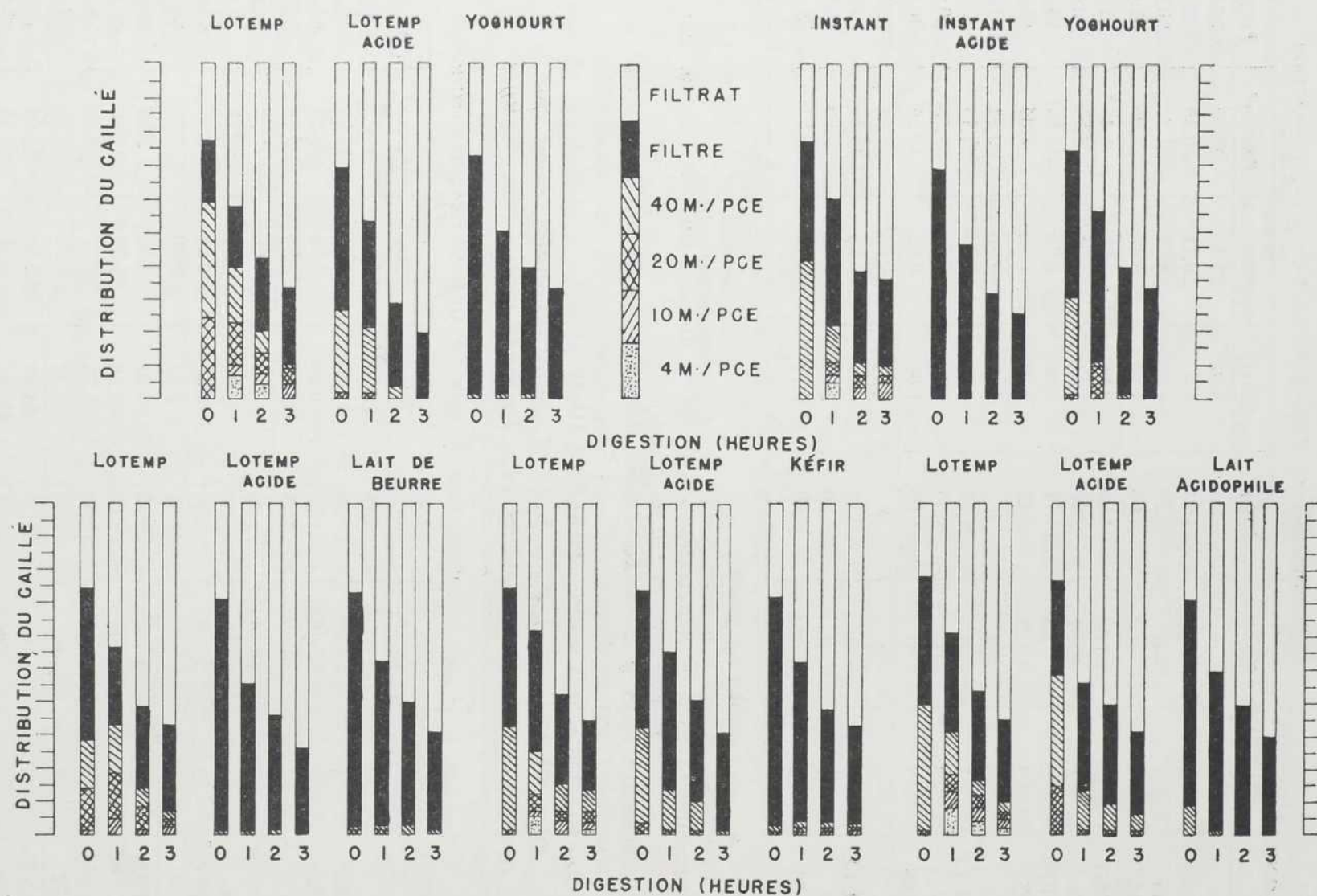


Figure III - 1. Influence de la fermentation et de l'acidification sur la digestibilité relative du lait.

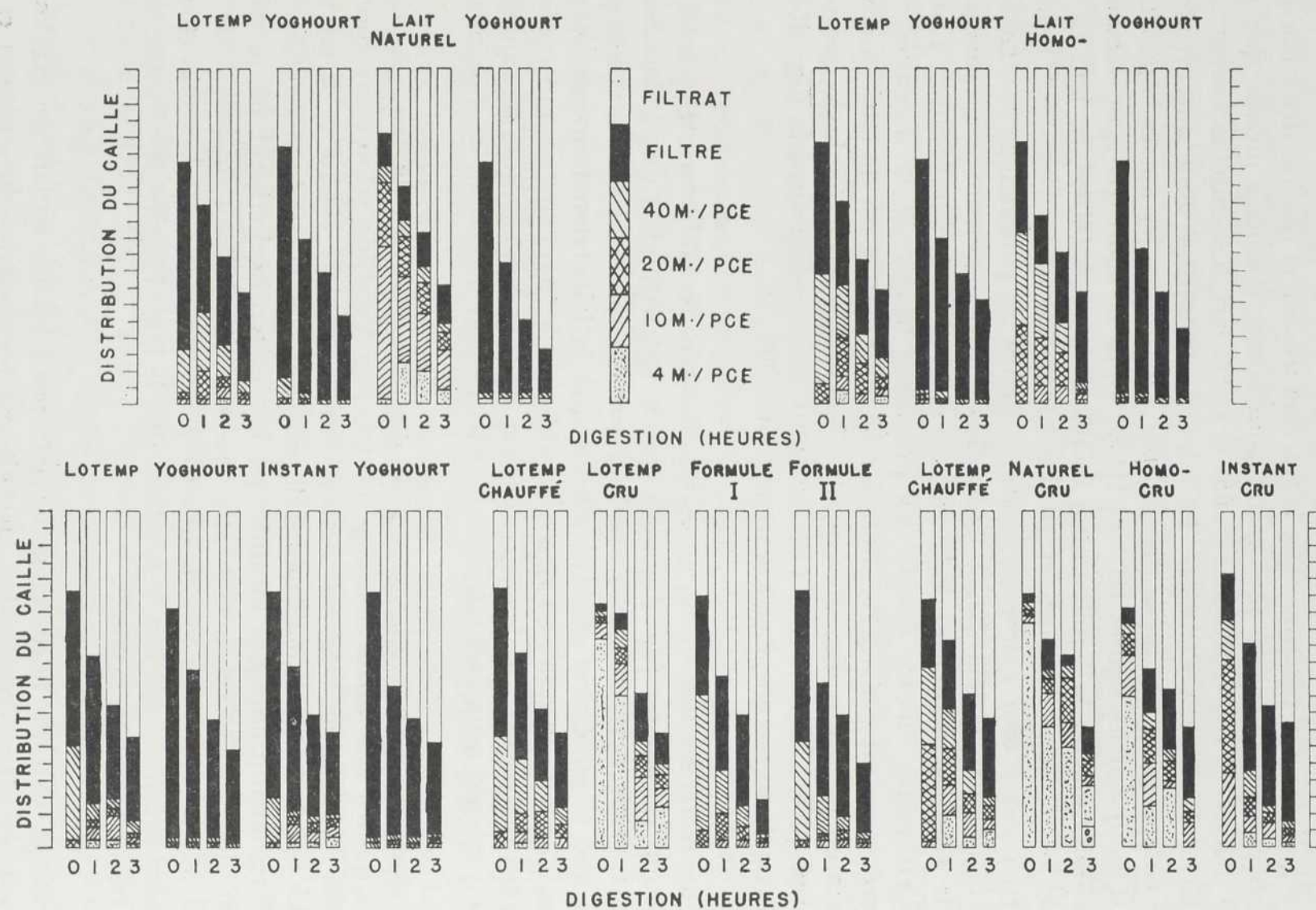


Figure III 2. Digestibilité relative de différents laits comparée à celle du « Lotemp ».

La figure III-1 transcrit dans l'ordre le résultat des cinq premières expériences des Tableaux III-1 à III-5. La distribution de l'azote dans les quatre premières fractions recueillies sur les tamis semble erratique, mais le comportement de la fraction soluble (trait blanc dans chaque colonne) et du papier-filtre (trait noir) est très régulière. On remarque que la fraction soluble et que ces deux fractions additionnées contiennent un plus grand pourcentage d'azote à mesure que progresse la digestion. Les répétitions d'analyse sur le lait "Lotemp" montrent aussi la régularité de ce comportement. Le lait-étalon constitue donc une excellente base de comparaison qui ne se dément pas dans toutes les autres expériences, comme l'indiquent les figures III-1 et III-2. Dans la figure III-1, on remarque que l'acidification ou la fermentation bonifient la digestibilité du lait, ce qui confirme les résultats de Doan et Dizikes (1942) et de Man (1949). Pour le yoghourt, presque tout l'azote se trouve, à toutes les périodes de la digestion, dans les deux fractions déjà citées ; la fraction soluble augmente progressivement, durant la digestion, au dépens de la fraction retenue sur le papier-filtre. L'acidification est moins efficace durant les premières heures de la digestion. La fermentation ne surpasse pas l'acidification lactique dans le cas du lait "Instant" ; ce dernier est bien plus digestible que le "Lotemp" selon la méthode que nous avons appliquée. Le kéfir et le lait acidophile augmentent aussi la digestibilité du "Lotemp", mieux que l'acidification artificielle.

La figure III-2 résume les résultats inscrits dans les Tableaux III-6 à III-10. Le "Lotemp" se montre plus digestible que le lait naturel et que le lait homogénéisé. La fermentation par les bactéries du yoghourt rend ces deux laits plus solubles que le lait-étalon et aussi soluble que le lait-étalon fermenté par ces bactéries. Le lait "Instant" est plus digestible que le "Lotemp", ce qui confirme les résultats précédents ; la fermentation par les bactéries lactiques ne l'améliore pas. Le yoghourt assure au lait dans tous les cas son maximum de digestibilité.

Le chauffage a aussi un effet décisif sur la digestibilité du lait. Ainsi, le lait frais, qui n'a subi aucun chauffage, est très peu digestible, selon notre épreuve artificielle de digestion. Le lait homogénéisé a déjà été chauffé ; il est plus digestible que le lait frais mais moins digestible que le lait-étalon, chauffé avant et après reconstitution. Les formules de lait maternisé jouissent de la même solubilité que le lait homogénéisé qui leur sert d'ingrédient de base. Le lait "Instant" est presque aussi soluble que le "Lotemp", même s'il n'est pas chauffé après reconstitution ; on sait, cependant, que le lait "Instant" est chauffé deux fois au cours de sa fabrication.

Il ressort enfin que le chauffage ne suffit pas à assurer au lait son maximum de digestibilité. La fermentation lactique par les bactéries du yoghourt est le seul traitement qui assure ce maximum d'après notre épreuve de digestibilité. L'acidification lactique au pH des laits fermentés se montre presque aussi efficace dans le cas du lait "Instant".

DISCUSSION

L'interprétation biologique de résultats obtenus par une méthode artificielle exige une grande prudence ; les résultats doivent se calibrer autant que possible sur des observations *in vivo* et la méthode doit se façonner aux conditions qui prévalent dans l'organisme vivant. Il n'est pas certain que l'épreuve de digestibilité, appliquée dans ce travail, remplisse toutes ces conditions ; elle n'est donc pas exempte de toute critique. Seule une épreuve appliquée chez les humains posséderait une valeur absolue, à condition qu'on la poursuive avec rigueur : cette condition est impossible. Doan et Dizikes (1942) ont observé que les rats donnent des résultats assez erratiques et ont préféré une méthode artificielle qui imite le mieux possible les conditions chimiques et physiques que l'on observe dans l'estomac humain. C'est cette méthode que nous avons utilisée, avec quelques modifications. La principale modification est la technique d'agitation qui tend à imiter le péristaltisme dans la méthode de Doan et Dizikes (1942). Durant la digestion, nous avons simplement imprimé aux flacons un mouvement rotatoire, sans que les résultats en soient affectés sensiblement.

Pour comparer notre méthode à celle de ces auteurs, nous avons fait l'épreuve de digestibilité sur quatre laits qu'ils ont eux-mêmes utilisés : le lait naturel, cru et chauffé, le lait homogénéisé et le lait de beurre. Les résultats obtenus par les deux méthodes sont très semblables, surtout si l'on examine la fraction soluble, la fraction retenue sur le filtre ou les deux fractions combinées. Par notre méthode, nous retrouvons un pourcentage légèrement plus élevé dans ces fractions, ce qui indique que notre technique d'agitation est un peu plus vigoureuse.

Nos résultats permettent d'évaluer l'influence de cinq facteurs sur la digestibilité du lait : le type de lait, le chauffage, l'homogénéisation, l'acidification et la fermentation. Dans chaque épreuve, le lait en poudre écrémé, de marque "Lotemp", reconstitué et chauffé, constituait le lait-étalon. Comme la plupart des auteurs, nous n'avons pu reconnaître d'influence à l'homogénéisation.

Parmi les laits frais ou reconstitués sans chauffage subséquent, le lait "Instant-Crino" est le plus digestible, tous les autres jouissant à peu près de la même digestibilité, digestibilité moins élevée que celle du lait-étalon et des témoins chauffés. Turner (1945) a reconnu que le chauffage au-dessus de la température de pasteurisation augmente la digestibilité à cause d'une hydrolyse plus prononcée des protéines durant le chauffage et la digestion enzymatique (Melnick et Oser, 1949). Parmi les laits chauffés, le lait "Instant-Crino" est encore le plus digestible, plus digestible que le lait-étalon ; le lait naturel est le moins digestible ; tous les autres laits occupent une position intermédiaire.

L'acidification artificielle par addition d'acide lactique augmente grandement la digestibilité des laits chauffés après reconstitution, ce qui confirme les résultats de Man (1949). L'acidification par fermentation lactique, telle qu'obtenue dans les laits fermentés, améliore beaucoup la digestibilité. De tous les

laits fermentés, le yoghourt est le plus efficace, peut-être à cause du pH plus bas qu'on y observe. Le lait acidifié artificiellement au même pH que celui du yoghourt possède une digestibilité presque aussi grande, produit aussi un caillé à particules aussi fines que le caillé du yoghourt. L'acidification artificielle au même pH que celui des autres laits fermentés améliore aussi la digestibilité du lait, mais à un moindre degré que la fermentation. Balasubramanian *et al.* (1955) ont aussi observé une digestibilité accrue dans les laits fermentés qu'ils ont étudiés.

Le rôle bienfaisant des laits fermentés sur la digestibilité peut résulter de l'acidification. Dans nos épreuves, nous avons ajusté les laits-témoins au pH des laits fermentés quelques heures seulement avant le début de l'épreuve. Au moment de l'épreuve, les protéines du lait fermenté s'étaient trouvées en milieu acide plus longtemps que celles des laits témoins, ce qui peut expliquer la digestibilité un peu plus élevée des laits fermentés. D'autre part, on sait très bien que le caillé des laits fermentés est différent du caillé obtenu par acidification à l'acide lactique ; la texture est continue dans les laits fermentés. Il faudrait donc attribuer à la fermentation cette digestibilité plus grande.

De toutes les explications fournies depuis Metchnikoff sur les bienfaits des laits fermentés, très peu ont survécu à la rigueur de l'analyse scientifique et la plupart sont tombées faute de preuves expérimentales. L'hypothèse de l'hygiène intestinale, assurée par l'ingestion massive de laits fermentés, a le mieux résisté. La synthèse de vitamines et la sécrétion d'antibiotiques par les bactéries lactiques ne semblent pas jouer un très grand rôle. La digestibilité accrue des protéines des laits fermentés offre, cependant, une explication. Le lait contient des quantités bien équilibrées de tous les acides aminés ; dans l'organisme normal, ces acides aminés sont libérés et absorbés par l'organisme. La fermentation par les bactéries lactiques produit un caillé plus fin et plus rapidement attaquant par les enzymes digestifs, ce qui facilite la digestion et l'absorption des protéines du lait sous forme d'acides aminés.

CONCLUSION

Par une épreuve artificielle de digestibilité, nous avons pu observer que tous les laits ne sont pas attaqués avec la même rapidité par les enzymes digestifs.

Le lait naturel, qui n'a subi aucun traitement, est le moins digestible. Les laits en poudre, après reconstitution, sont un peu plus digestibles, tandis que le lait en poudre fabriqué par un nouveau procédé qui facilite sa reconstitution, le lait "Instant", est le plus digestible.

Le chauffage du lait naturel ou des laits en poudre reconstitués augmente grandement leur digestibilité, selon le critère que nous avons employé.

La fermentation par des associations de bactéries, telles qu'on les trouve dans les laits fermentés, augmente la digestibilité de tous les laits chauffés. L'acidifi-

cation, équivalente de l'acidité des laits fermentés et assurée par l'addition d'acide lactique, est souvent aussi efficace que l'acidification naturelle.

À la lumière de ces résultats, nous avons discuté du rôle bienfaisant des laits fermentés sur la santé.

BIBLIOGRAPHIE

- BABCOCK, C. J. 1942 *Effect of homogenization on the curd tension, digestibility, and keeping quality of milk.* Tech. Bull. U. S. Dep. Agr., No. 832.
- BALASUBRAMANIAN, S. C., LILY, G., MANI, G. S., et BASU, K. P. 1955 Nutritive value of the proteins of milk and some indigenous milk products. *Indian J. Med. Research*, 43, 255-264.
- BALDWIN, R. R., LOWRY, J. R., et THIESSEN, R. 1951 *Food Research*, 16, 107.
- BÉHAR, M., VITERI, F., et SCRIMSHAW, N. S. 1957 Treatment of severe protein deficiency in children (kwashiorkor). *Am. J. Clin. Nutrition*, 5, 506-515.
- CALLOWAY, Doris H., KURTZ, G. W., McMULLEN, J. J., et THOMAS, L. V. 1956 The absorbability of natural and modified fats. *Food Research*, 21, 621-629.
- COLAS, Juliette, DEMAUX, Germaine, SIMONET, H., et STERNBERG, J. 1950 Recherches sur la biochimie des composés phosphorés du lait. II. Devenir du phosphore protéique au cours de la digestion. *Compt. rend.*, 231, 881-883.
- CZECH, E. 1957 Die Magenverdauung der homogenisierten Milch beim Schulkind. *Monatsschr. Kinderheilk.*, 105, 88-90.
- DAS, D. P., MURTHY, H. B. N., et SWAMINATHAN, M. 1953 Studies on the nutritive impairment of proteins heated with carbohydrates. I. *In vitro* digestion studies. *Bull. Central Food Tech. Research Inst.*, 2, 359-361.
- DOAN, F. J. 1938 Soft curd milk. A critical review of the literature. *J. Dairy Sci.*, 21, 739.
- DOAN, F. J., et DIZIKES, J. L. 1942 *Digestion characteristics of various types of milk compared with human milk.* Bull. 428. The Pennsylvania State College, State College, Penn.
- DOAN, F. J., et FLORA, C. C. 1939 *Comparative digestibility of some soft curd milks in vitro.* Bull. 380. The Pennsylvania State College, State College, Penn.
- FAWNS, H. T., et BOURNE, G. H. 1953 The effect of fruit-syrup supplements on the assimilation of food from the alimentary canal. I. Their effect on the digestion of milk in the stomach of young rats. *Brit. J. Nutrition*, 7, 13-20.
- FRASER, D., et POWELL, R. E. 1950 The kinetics of trypsin digestion. *J. Biol. Chem.*, 187, 803-820.
- GEIGER, E. 1951 Extra caloric function of dietary components in relation to protein utilization. *Federation Proc.*, 10, 670-675.
- GORDON, H. H., LEVINE, S. Z., et McNAMARA, H. 1947 *Am. J. Diseases Children*, 73, 442.
- HILL, R. L. 1933 *A decade and a half of soft curd milk studies.* Utah Agr. Exp. Sta. Cir. No. 101.
- HINKEL, E. T., Jr., et ARNOLD, A. 1951 The effect of the activity state of the enzymes on the *in vivo* activity of papain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 54, 277-281.
- ILGNER, G., et THURAU, R. 1952 Milchernährung und Verdauung beim Säugling. *Milch-wissenschaft*, 7, 378-381.
- KOCH, J. R., et DUELLMAN, M. Dolorosa 1941 A convenient and efficient method for the determination of the digestibility of fats with pancreatic or other lipases. *Oil & Soap*, 18, 86-88.
- LEMBKE, A., KAUFMANN, W., et SCHMIDT, Helga 1953 Enzymatische Studien an Milch-proteinen. *Milchwissenschaft*, 8, 10-16.

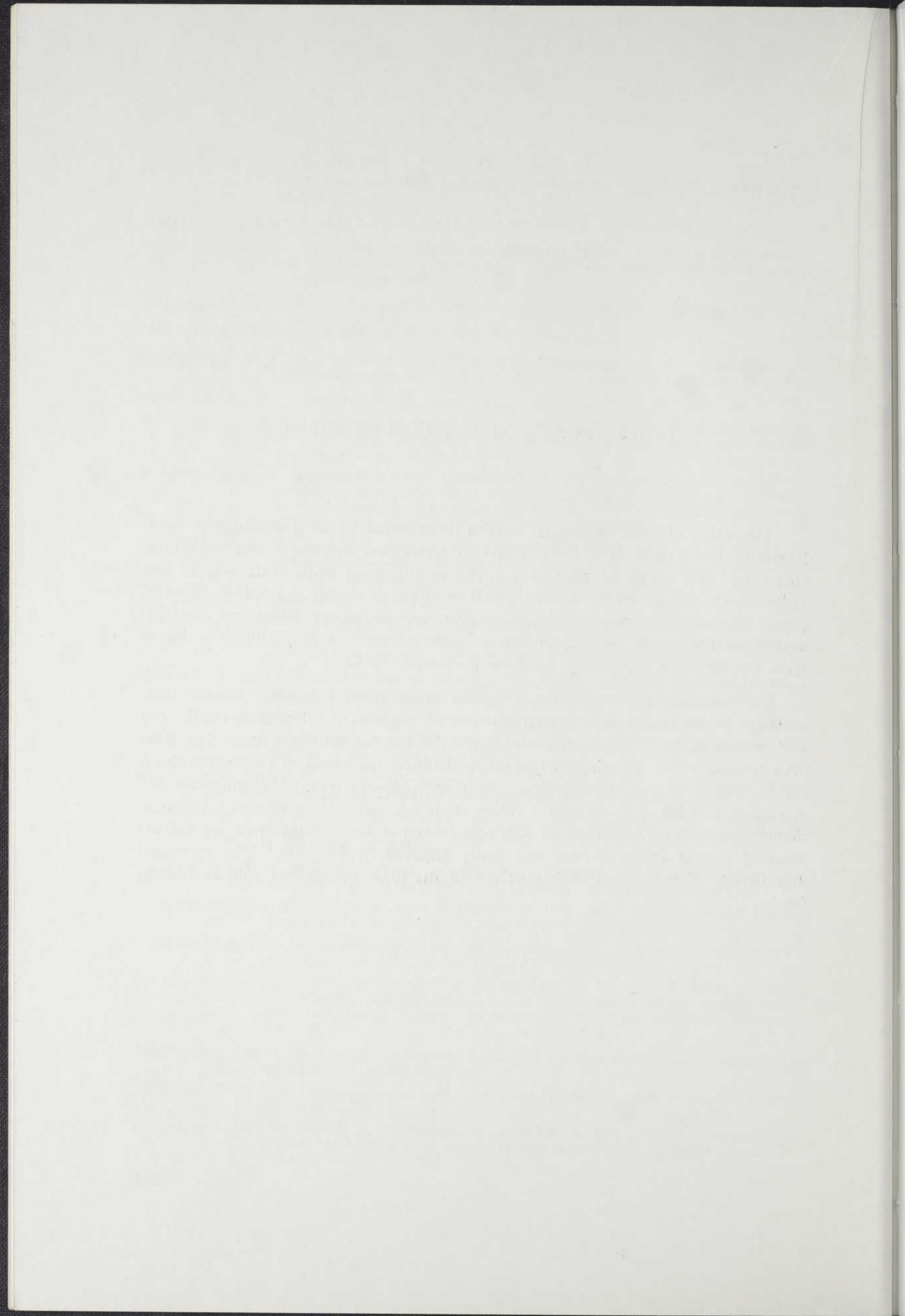
- LLOYD, L. E., et CRAMPTON, E. W. 1957 The relation between certain characteristics of fats and oils and their apparent digestibility by young pigs. *J. Animal Sci.*, **16**, 377-382.
- MADER, I. J., SCHROEDER, L. J., et SMITH, A. H. 1949 *J. Nutrition*, **39**, 341.
- MAN, T. J. de 1949 *Voederproeven over de invloed van organische zuren (vooral in verband met het aanzuren van ondermilk)*. Institute of Modern Feeding, Amerfoort, Hoagland, Netherlands.
- MELLANDER, O. 1955 The nutritional significance of some peptides. *Voeding*, **16**, 363-367.
- MELNICK, D., et OSER, B. L. 1949 *Food Technol.*, **3**, 57.
- MOGENSEN, M. S., et THOMASOW, J. 1953 Über Unterschiede in der Spaltbarkeit von Caseinpräparaten durch das Labenzym. *Intern. Dairy Congr.*, **3**, 1308-1316.
- MÖSSMER, E. 1955 Viehfutter, Milch, Kind. Münch. med. Wochschr., **97**, 1276.
- RANDOUIN, Lucie, et CAUSERET, J. 1956 Recherches préliminaires sur l'utilisation digestive et sur la valeur biologique des protides de diverses espèces de fromages. *Ann. technol. agr. (Paris)*, **5**, 527-537.
- RANDOUIN, Lucie, JOURDAN, Colette, et CAUSERET, J. 1954 Influence du caillage sur l'utilisation digestive et sur la valeur biologique des protides du lait. Essais de supplémentation des protides du lait, du caillé et du Camembert par la cystine. *Comp. rend. acad. agr. France*, **40**, 304-306.
- RICHTER, K., et SCHILLER, K. 1956 Untersuchungen zur Bestimmung der Verdaulichkeit und der biologischen Wertigkeit des Milcheiweisses in Magermilchpulvern, die nach verschiedenen Systemen getrocknet wurden. *Z. Tierernähr. Futtermittelk.*, **11**, 32-37.
- ROINE, P., GYLLENBERG, H., et ROSSANDER, Marjatta 1955 *Role of Proteins in the response of infants to human milk and cow's milk*. In *Biochemistry of Nitrogen*, pp. 406-411. Suomalainen Tiedeakatemia, Helsinki.
- SAGER, C. A. 1956 Über den fermentativen Abbau der Proteine und Fette in homogenisierter und nichthomogenisierter Kuhmilch. Zugleich eine kritische Studie zu der Arbeit von H. Ewerbeck und W. Jaeger « Über den fermentativen Abbau der Proteine und Fette moderner Säuglingsnahrungen », *Z. Kinderheilk.*, **75**, 496. *Z. Kinderheilk.*, **78**, 210-218.
- SASAKI, R., et KAMIYA, M. 1952 Chemical studies on the preparation of peptones. II. Experiments on the action of pancreatin. *Japan. J. Zootech. Sci.*, **23**, 110-113.
- SCHROEDER, L. J., IACOBELLIS, M., LEES, Helen, et SMITH, A. H. 1953a The effect of heat on the nutritive value of milk proteins as influenced by water and fat. *J. Nutrition*, **50**, 351-360.
- SCHROEDER, L. J., IACOBELLIS, M., et SMITH, A. H. 1953b Heat processing and the nutritive value of milk and milk products. *J. Nutrition*, **49**, 549-561.
- SCHROEDER, L. J., STEWART, R. A., et SMITH, A. H. 1951 The nutritive effect of heating lactalbumin in the presence of various reducing sugars. *J. Nutrition*, **45**, 61-74.
- STORRS, A. B. 1941 An analysis of the relationship between the curd tension and the curd surface area of milk. *J. Dairy Sci.*, **24**, 1041-1046.
- SULLIVAN, R. A., DOWNEY, W. E., STANTON, Elizabeth K., VAN WAGONER, Elizabeth, et HANSELL, Mary J. 1950 Liberation of amino acids and active peptides from raw, heated and vitamin-free casein by tryptic digestion. *Federation Proc.*, **9**, 236.
- TRENDTEL, - 1954 Ernährungsphysiologische Betrachtungen über Gervais-Käse. *Molkerei-Ztg (Hildesheim)*, **8**, 743-744.
- TURNER, A. W. 1945 Digestibility of milk as affected by various types of treatment. *Food Research*, **10**, 52-59.
- WOLMAN, I. J., BOROWSKY, S., NICHOLAS, R., et SPUR, B. 1942 Soft curd homogenized milk in infant feeding. A laboratory and clinical study. *J. Pediat.*, **21**, 45-72.

DIGESTIBILITY OF FERMENTED MILKS

SUMMARY

The value of milk as human food is determined by its digestibility. Such determination is difficult where humans are concerned and the results are erratic with rats. Our artificial method consists in digesting milk with pepsin and hydrochloric acid under conditions which simulate, as closely as possible, those of gastric digestion. During the digestion process, samples are taken and fractionated according to the fineness of curds. The criterion of digestibility is based upon the nitrogen percentage contained in each fraction.

We have studied five factors: type of milk, homogenization, acidification, heating, fermentation by microorganisms of yoghourt, kefir, buttermilk and acidophilus milk. Powder milk and especially Instant milk are more digestible than natural milk. Heating increases digestibility considerably. Homogenization has no effect, whereas fermentation, that of yoghourt especially, improves the digestibility of all types of milk. When artificially added, lactic acid is often as effective as natural acidification through fermentation. These two treatments produce a curd finely divided and easily digested by enzymes. The increased digestibility of fermented milk partly explains their beneficent rôle as human food.



APPENDICE

SYNTHÈSE DES VITAMINES PAR LES BACTÉRIES LACTIQUES EN MILIEUX PURIFIÉS



APPENDICE

SYNTHÈSE DES VITAMINES PAR LES BACTÉRIES LACTIQUES EN MILIEUX PURIFIÉS *

Dans la première partie de ce travail, nous avons étudié l'influence des bactéries lactiques sur la teneur du lait en thiamine, en riboflavine, en acide pantothénique, en acide nicotinique et en acide ascorbique. L'analyse des résultats révèle la consommation de vitamines pendant les premières heures d'incubation ; durant la période suivante, le lait s'enrichit progressivement, et sa teneur vitaminique atteint, après une semaine d'incubation, le niveau initial. L'explication de ce phénomène nous échappe, mais deux hypothèses semblent plausibles : véritable synthèse par les bactéries, une fois terminée la phase exponentielle de croissance ; libération dans le milieu de vitamines, emmagasinées jusque là dans les cellules sous forme conjuguée, non hydrolysable par la chaleur, les acides ou les enzymes.

Nous nous emploierons, dans cette étude, à vérifier la première hypothèse, laquelle suggère la formation d'enzymes adaptatifs qui permettent la synthèse des vitamines après une période de temps plus ou moins longue. Ce phénomène est classique en bactériologie : le comportement de *Lactobacillus fermenti* ATCC 9338, qui est tributaire de la thiamine durant les premières heures d'incubation et qui la synthétise par la suite à partir de ses parties thiazole et pyrimidine, est typique (Sarett et Cheldelin, 1944).

L'étude des bactéries lactiques en milieux purifiés et leur influence quantitative sur la teneur du milieu en vitamines jetteront peut-être une lumière nouvelle sur l'interprétation des résultats antérieurs. Ce projet nécessite la recherche et

* Depuis l'exécution de ce travail en 1953, plusieurs découvertes importantes ont enrichi nos connaissances en nutrition microbienne. Nous devons reporter ces résultats en appendice tant que nous n'aurons pas repris l'étude de la nutrition des bactéries lactiques à la lumière des connaissances actuelles.

Nous nous excusons de cette lacune auprès du lecteur à qui nous suggérons, pour la mesurer et la combler partiellement, les revues de Cheldelin et King (1953), Guirard (1958), Hendlin (1954), Magasanik (1957), Stockstad et al. (1955) et Wright (1956).

l'adoption d'un milieu d'inoculation et d'un milieu purifié appropriés. Ces travaux feront l'objet des deux premiers articles. Le dernier article sera consacré à la synthèse de la thiamine et de la riboflavine en milieux purifiés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Bactéries lactiques. Le matériel microbien comprend trois souches de chacune des bactéries thermophiles suivantes: *Thermobacterium yoghourtii*, *T. bulgaricum*, *T. acidophilum* et *Streptococcus thermophilus*; trois souches de bactéries mésophiles A, *Streptococcus paracitrovorus*, *S. cremoris*, *S. lactis*, *S. liquefaciens* et *Propionibacterium shermanii*; trois souches de la bactérie mésophile B, *Lactobacillus casei*. L'association des bactéries du yoghourt, *T. yoghourtii*, *T. bulgaricum* et *S. thermophilus*, est aussi représentée par trois souches. Enfin, *Lactobacillus casei* ATCC 7469, *L. arabinosus* 17-5 et *S. faecalis* R, qui servent de bactéries-tests dans la détermination de certaines vitamines B et de certains acides aminés et dont les exigences nutritives sont connues, représentent les témoins. Les organismes d'essai sont entretenus en profondeur dans le milieu *Micro-Assay Culture Agar* (Difco Laboratories, 1953). Toutes les autres bactéries sont entretenues dans du lait écrémé stérile, enrichi de 0.5% d'extrait de levure et de 3% de carbonate de calcium.

Conditions d'incubation. La température d'incubation est 41 C pour les thermophiles et les bactéries du yoghourt, 22 C pour les mésophiles A, 37 C pour les mésophiles B et les bactéries-tests.

Milieu d'inoculation. Les milieux purifiés doivent êtreensemencés avec des cellules lavées pour éviter que des facteurs de croissance soient entraînés avec l'inoculum et masquent les résultats. Le lait ne se prête pas au lavage des cellules. Les cultures entretenues dans le lait devront donc subir un ou plusieurs passages sur un milieu intermédiaire qui permette cette opération. Le milieu d'inoculation, en plus de satisfaire aux conditions de pH, de potentiel d'oxydo-réduction et d'aération, doit contenir tous les aliments essentiels et des substances stimulantes. De ces qualités dépendra la netteté de la croissance bactérienne en milieu purifié (Snell, 1951). Le milieu devra supporter, durant cinq repiquages consécutifs, une croissance rapide et abondante, et permettre la récolte de cellules très actives; il devra être aussi limpide que possible et se séparer facilement des cellules par centrifugation. La composition des trois premiers milieux que nous avons étudiés est donnée au Tableau 1; ces milieux ont été proposés et standardisés par "The Association of Vitamin Chemists" (1951) pour les trois bactéries-tests qui servent de témoins dans ce travail. Nous avons essayé trois autres milieux dont la composition est rapportée au Tableau 2. Une douzaine de milieux furent encore mis à l'essai et, après quelques tâtonnements, nous avons arrêté notre choix sur les deux milieux dont la composition est indiquée au Tableau 12.

TABLEAU 1
Composition des milieux d'inoculation

INGRÉDIENTS	MILIEU I	MILIEU II	MILIEU III
Bacto-Peptide*	5 g	5 g	
Bacto-Yeast Extract*		1 g	
Bacto-Thiamin Assay Medium*			22 g
Trypsin-Hydrolyzed Casein**			25 ml
L-Tryptophane			25 mg
Xanthine			5 mg
Thiamine			10 µg
Lactose	10 g		
Glucose		10 g	
Acétate de sodium	10 g	10 g	
Solution minérale « A »***	5 ml	5 ml	
Solution minérale « B »***	5 ml	5 ml	
Volume final	500 ml	500 ml	500 ml
pH	6.8	6.8	6.8

*Difco Laboratories Incorporated, Detroit, Michigan.

**Solution à 10% obtenue de Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio.

***Solution minérale « A » : K_2HPO_4 , 25 g ; KH_2PO_4 , 25 g ; eau distillée, 500 ml.

Solution minérale « B » : $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 10 g ; NaCl, 0.5 g ; $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0.5 g ; $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$, 0.5 g ; HCl concentré, 5 gouttes ; eau distillée, 500 ml.

Ces milieux sont distribués à raison de 10 ml par tube.

Stérilisation : 121 C, 15 minutes.

TABLEAU 2
Composition des milieux d'inoculation à base de sérum de lait

INGRÉDIENTS	MILIEU IV	MILIEU V	MILIEU VI
Sérum filtré*	350 ml	350 ml	350 ml
Thiamine	40 µg		
Riboflavine	80 µg		
Acide pantothénique	400 µg		
Acide folique	5 µg		40 µg
Cystine	800 mg		
L-Tryptophane	200 mg		
Solution minérale « A »**	4 ml	4 ml	4 ml
Solution minérale « B »**	4 ml	5 ml	4 ml
Eau distillée	42 ml	41 ml	42 ml
Volume final	400 ml	400 ml	400 ml
pH	6.8	6.8	6.8

* Du sérum obtenu par coagulation à la présure est écrémé, chauffé à 95 C et ajusté à pH 4.6-4.7 avec de l'acide acétique à 10%. Après chauffage à 100 C pendant 30 minutes, le sérum est filtré sur papier-filtre Whatman no 42 et ajusté à pH 6.8 avec une solution d'hydroxyde de sodium à 40%.

**Voir la composition au bas du Tableau 1.

Ces milieux sont distribués à raison de 10 ml par tube.

Stérilisation : 121 C, 15 minutes ; les milieux se troublent mais deviennent limpides après une nuit au réfrigérateur.

Milieu purifié. Ce milieu doit ressembler au milieu d'inoculation et fournir aux bactéries tous les aliments essentiels, excepté la vitamine à l'essai. Il peut aussi servir de milieu d'inoculation, si on l'enrichit de la vitamine en cause. La procédure idéale est de préparer un milieu de base synthétique capable d'entretenir la croissance de toutes les bactéries lactiques et de ne retenir que les aliments essentiels à chaque souche. Ce serait le milieu d'inoculation. Le même milieu, dépourvu de la vitamine à l'essai, deviendrait le milieu purifié. Actuellement, on ne connaît pas de milieu synthétique pour ces bactéries lactiques. Il faut donc recourir à des milieux semi-synthétiques, purifiés de telle ou telle vitamine. Nous avons donc employé les milieux purifiés qui servent au dosage microbiologique de la thiamine, de la riboflavine, de l'acide pantothénique et de l'acide nicotinique.

Le protocole des expériences est le suivant : chaque souche est d'abord ensemencée dans un milieu d'inoculation approprié (Tableau 12) ; après 18 à 24 heures d'incubation, les cellules sont sédimentées par centrifugation, le milieu est décanté et les cellules sont portées en suspension dans 10 ml de solution isotonique (solution de NaCl à 0.85%). La centrifugation est répétée et les cellules sont remises en suspension dans le sérum physiologique. Une goutte de cette suspension sert à inoculer le milieu purifié (Tableau 13). Seuls les milieux purifiés de thiamine ou de riboflavine se sont avérés utilisables.

Dosage de la thiamine et de la riboflavine. Nous avons dosé la thiamine par la méthode fluorométrique, après digestion des échantillons par l'acide, la chaleur et la clarase (*The Association of Vitamin Chemists*, 1951). Des essais préliminaires ont prouvé que la purification de l'échantillon digéré par absorption sur Decalso est inutile. Il est nécessaire, cependant, de débarrasser l'isobutanol de sa fluorescence en l'agitant pendant 30 minutes en présence de 1.5% de Norit A (Pader, 1943). La riboflavine est dosée par la méthode fluorométrique, après digestion à l'acide et à la chaleur (*The Association of Vitamin Chemists*, 1951).

RÉSULTATS

Milieu d'inoculation. Le Tableau 3 indique que les milieux I à III ne conviennent pas aux thermophiles ; la croissance des autres bactéries est souvent très lente ; les bactéries-tests y poussent très bien. Ce tableau montre aussi la supériorité des milieux à base de lait (Tableau 2) sur les milieux précédents. Toutes les souches y croissent rapidement. Les vitamines ajoutées au sérum filtré sont inutiles, car la croissance est aussi abondante et aussi rapide dans le milieu V que dans les milieux IV et VI. Le milieu VI contient une dose d'acide folique équivalente à l'activité du facteur *citrovorum* (Sauberlich et Bauman, 1948). Le milieu V serait donc le milieu d'inoculation idéal si sa préparation n'était pas aussi irrégulière ; fréquemment, il se trouble sans qu'il soit possible de lui restituer sa limpidité.

TABLEAU 3

Croissance des bactéries lactiques dans les milieux I à VI

ESPÈCES BACTÉRIENNES	MILIEUX					
	I	II	III	IV	V	VI
<i>Thermobacterium yoghourtii</i>	0/3*	0/3	0/3	3/3	3/3	3/3
<i>Thermobacterium bulgaricum</i>	0/3	2/3	0/3	3/3	3/3	3/3
<i>Streptococcus thermophilus</i>	3/3	1/3	3/3	3/3	3/3	3/3
<i>Thermobacterium acidophilum</i>	2/3**	3/3	3/3**	3/3	3/3	3/3
<i>Streptococcus paracitrovorus</i>	0/3	3/3**	3/3	3/3	3/3	3/3
<i>Streptococcus cremoris</i>	0/3	3/3**	3/3	3/3	3/3	3/3
<i>Streptococcus lactis</i>	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
<i>Streptococcus liquefaciens</i>	3/3**	3/3**	3/3**	3/3	3/3	3/3
<i>Lactobacillus casei</i>	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
Bactéries du yoghourt.....	2/3	1/3**	3/3	3/3	3/3	3/3
<i>Streptococcus faecalis</i> R.....	1/1	—	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Lactobacillus faecalis</i> ATCC 7469.....	1/1	—	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Lactobacillus arabinosus</i> 17-5.....	1/1	—	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Propionibacterium shermanii</i>	3/3**	3/3**	3/3**	3/3	3/3	3/3

*Le numérateur indique le nombre de souches qui ont poussé, le dénominateur le nombre total de souches à l'essai.

**Croissance observée après 48 heures ou plus. Toutes les autres observations furent faites après 24 heures d'incubation.

TABLEAU 4

Composition du milieu de base A

Acid-Hydrolysed Casein*.....	10	g	Solution minérale « A »**.....	20	ml
Hydrolysed Casein*.....	10	g	Solution minérale « B »**.....	20	ml
Glucose.....	20	g	Nicotinamide.....	800	µg
Lactose.....	20	g	Pantothénate de calcium.....	800	µg
Acétate de sodium.....	20	g	Acide nicotinique.....	800	µg
Citrate de sodium.....	20	g	Riboflavine.....	800	µg
Asparagine.....	0.2	g	Thiamine.....	400	µg
L-Tryptophane.....	0.2	g	Acide p-amino-benzoïque.....	400	µg
L-Cystine.....	0.4	g	Pyridoxal.....	400	µg
Sulfate d'adénine.....	0.02	g	Pyridoxamine.....	400	µg
Sulfate de guanine.....	0.02	g	Acide folique.....	20	µg
Uracil.....	0.02	g	Biotine.....	4	µg
Xanthine.....	0.02	g	Vitamine B ₁₂	10	µg
Acide oléique.....	0.02	g	Volume final.....	1000	ml
Tween 80.....	2	g	(double concentration)		
			pH.....	6.8	

*Nutritional Biochemicals Corporation, Cleveland, Ohio.

Hydrolyzed Casein = Pancreatin-Hydrolyzed Casein.

**Voir la composition au bas du Tableau 1.

TABLEAU 5

Composition des milieux d'inoculation contenant le milieu de base A

INGRÉDIENTS	MILIEUX			
	VII	VIII	IX	X
Milieu de base « A »	300 ml	200 ml	200 ml	400 ml
Bacto-Proteose-Peptide*	2 g			
Bacto-Yeast Extract*	0.6 g			
Bacto-Malt Extract*	0.3 g			
Jus de tomate filtré**		40 ml		
Acide désoxyribonucléique		20 mg		
Acide folique				800 µg
Eau distillée	100 ml	160 ml	200 ml	0
Volume final	400 ml	400 ml	400 ml	400 ml
pH	6.8	6.8	6.8	6.8

*Difco Laboratories Incorporated, Detroit, Michigan.

**Williams *et al.* (1949)

Ces milieux sont distribués à raison de 10 ml par tube.

Stérilisation : 121 C, 15 minutes.

TABLEAU 6

Composition du milieu de base B

Bacto-Folic Assay Medium*	45 g	Acide folique	12 µg
Acétate de sodium	12 g	Vitamine B ₁₂	12 µg
Asparagine	120 mg	Acide désoxyribonucléique	60 mg
Xanthine	12 mg	Volume final	600 ml
		pH	6.8

*Difco Laboratories Incorporated, Detroit, Michigan.

TABLEAU 7

Composition des milieux d'inoculation contenant le milieu de base B

INGRÉDIENTS	MILIEU XI	MILIEU XII	MILIEU XIII
Milieu de base B	200 ml	200 ml	200 ml
Sérum filtré*	0	20 ml	40 ml
Eau distillée	200 ml	180 ml	160 ml

*Voir la composition et le mode de préparation au bas du Tableau 2.

TABLEAU 8

Croissance des bactéries lactiques dans les milieux VII à XIII

ESPÈCES BACTÉRIENNES	MILIEUX						
	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII
<i>Thermobacterium yoghourtii</i>	0/3*	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>Thermobacterium bulgaricum</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Bactéries du Yoghourt.....	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>Streptococcus thermophilus</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>Streptococcus paracitrovorus</i>	3/3**	3/3**	3/3**	3/3**	0/3	0/3	0/3
<i>Streptococcus cremoris</i>	0/3	3/3**	3/3**	3/3**	0/3	0/3	0/3
<i>Thermobacterium acidophilum</i>	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
<i>Lactobacillus casei</i>	1/3**	3/3**	3/3**	3/3**	3/3**	3/3	3/3
<i>Propionibacterium shermanii</i>	3/3**	3/3	3/3**	3/3**	3/3**	3/3**	3/3**
<i>Streptococcus lactis</i>	3/3**	3/3	3/3**	3/3**	3/3**	3/3	3/3**
<i>Streptococcus liquefaciens</i>	3/3**	3/3	3/3**	3/3**	3/3**	3/3**	3/3**
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469.....	1/1	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1
<i>Streptococcus faecalis</i> R.....	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
<i>Lactobacillus arabinosus</i> 17-5.....	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1

* Le numérateur indique le nombre de souches qui ont poussé, le dénominateur le nombre total de souches à l'essai.

**Croissance observée après 48 heures ou plus. Toutes les autres observations furent faites après 24 heures d'incubation.

TABLEAU 9

Composition des milieux d'inoculation à base de sérum de lait traité*

MILIEUX	TRAITEMENTS
XIV	Sérum filtré*, 360 ml ; eau distillée, 40 ml. Le milieu dilué est distribué en tubes par portions de 10 ml. Stérilisation : 121 C, 15 minutes.
XV	Milieu XIV stérilisé par filtration sur filtre de verre de porosité UF.
XVI	400 ml de sérum filtré sont ajustés à pH 4.5 avec de l'acide acétique à 10% et mélangés à 27 g de Florisil. Le mélange est agité pendant 30 minutes et filtré sur papier-filtre Whatman No 1. Le pH est ajusté de nouveau à 4.5 et l'adsorption sur Florisil répétée. Le mélange est filtré et ajusté à pH 6.8. 360 ml de ce mélange sont dilués à 400 ml avec de l'eau distillée. La distribution et la stérilisation se font comme pour le milieu XV.
XVII	Milieu XVI additionné de 400 µg de riboflavine. L'adsorption sur Florisil appauvrit le sérum filtré en riboflavine.

*Voir la composition du sérum filtré au bas du Tableau 2.

TABLEAU 10

*Composition des milieux d'inoculation déshydratés**

MILIEU XVIII <i>Trypsin Digest Broth</i>	MILIEU XIX <i>Stock Culture Broth</i>	MILIEU XX <i>Micro-Inoculum Broth</i>
Trypsinized Milk..... 20 g	Beef Heart Infus..... 500 g	Bacto-Yeast Extract.... 20 g
Jus de tomate..... 10 g	Protéose-Peptide..... 10 g	Protéose-Peptide III... 5 g
Bacto-Peptide..... 8 g	Bacto-Gélatine..... 10 g	Bacto-Dextrose..... 10 g
Bacto-Dextrose..... 4 g	Bacto-Dextrose..... 5 g	KH ₂ PO ₄ 2 g
Bacto-Dextrine..... 4 g	Caséine soluble..... 5 g	
	Na ₂ HPO ₄ 4 g	pH 6.7
pH 7.0	Citrate de sodium..... 3 g	
	pH 7.0	

*Milieux de Difco Laboratories Incorporated, Detroit, Michigan.

TABLEAU 11

Croissance des bactéries lactiques dans les milieux XIV à XX

ESPÈCES BACTÉRIENNES	MILIEUX						
	XIV	XV	XVI	XVII	XVIII	XIX	XX
<i>Thermobacterium yoghourtii</i>	3/3*	3/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3
<i>Thermobacterium bulgaricum</i>	3/3	3/3	0/3	0/3	3/3	0/3	3/3
Bactéries du Yoghourt.....	3/3	3/3	0/3	0/3	3/3	0/3	3/3
<i>Streptococcus thermophilus</i>	3/3	3/3	0/3	0/3	3/3	0/3	3/3
<i>Streptococcus paracitrovorus</i>	3/3	3/3	0/3	0/3	3/3	3/3**	3/3
<i>Streptococcus cremoris</i>	3/3	3/3	0/3	0/3	3/3	3/3**	3/3
<i>Thermobacterium acidophilum</i>	3/3	3/3	0/3	0/3	3/3	0/3	3/3
<i>Lactobacillus casei</i>	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3**	3/3
<i>Propionibacterium shermanii</i>	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
<i>Streptococcus lactis</i>	3/3	3/3	0/3	0/3	3/3	3/3**	3/3
<i>Streptococcus liquefaciens</i>	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469.....	1/1	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1	1/1
<i>Lactobacillus arabinosus</i> 17-5.....	1/1	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1**	1/1
<i>Streptococcus faecalis</i> R.....	1/1	1/1	0/1	0/1	1/1	1/1**	1/1

*Le numérateur indique le nombre de souches qui ont poussé, le dénominateur le nombre total de souches à l'essai.

**Croissance observée après 48 heures ou plus. Toutes les autres observations furent faites après 24 heures d'incubation.

Nous avons alors abordé le problème d'un angle nouveau. Il s'agit de préparer un milieu synthétique ou semi-synthétique qui contienne toutes les substances nutritives nécessaires à la croissance des bactéries lactiques (Snell, 1951). Pour le purifier, il suffirait de ne retenir que les substances essentielles et de le débarrasser de la vitamine à l'essai. Nous avons donc préparé le milieu de base A dont la composition apparaît au Tableau 4; la composition des milieux à base du milieu A est indiquée au Tableau 5. Le milieu de base A contient, en plus des substances essentielles communes à la majorité des bactéries lactiques, des composés dont on connaît depuis peu l'importance: le lactose (Hoff-Jørgensen *et al.*, 1947; Snell *et al.*, 1948), l'acide oléique (Collins *et al.*, 1950; Williams *et al.*, 1947), le Tween 80 (complexe de monooléate de sorbitan, Williams *et al.*, 1947) et certaines formes d'acide nicotinique, de pyridoxine et de vitamine B₁₂ (Kitay *et al.*, 1950; Shorb, 1948). Le milieu A contient aussi le phosphate de pyridoxal et le phosphate de pyridoxamine (McNutt et Snell, 1950). Le milieu VII (Tableau 5) est enrichi de substances naturelles; le milieu VIII contient de l'acide désoxyribonucléique (Kitay *et al.*, 1950) et le facteur *Lactobacillus bulgaricus* (jus de tomate filtré, Williams *et al.*, 1949). Quant au milieu X, il est enrichi d'une dose d'acide folique équivalente à l'activité du

TABLEAU 12
Choix définitif des milieux d'inoculation

ESPÈCES BACTÉRIENNES	MILIEUX	ESPÈCES BACTÉRIENNES	MILIEUX
<i>Thermobacterium yoghourtii</i>	XVIII	<i>Lactobacillus casei</i>	XX
<i>Thermobacterium bulgaricum</i>	XX	<i>Propionibacterium shermanii</i>	XX
Bactéries du yoghourt.....	XVIII	<i>Streptococcus lactis</i>	XVIII
<i>Streptococcus thermophilus</i>	XX	<i>Streptococcus liquefaciens</i>	XX
<i>Streptococcus paracitrovorus</i>	XVIII	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469.....	XX
<i>Streptococcus cremoris</i>	XX	<i>Lactobacillus arabinosus</i> 17-5.....	XX
<i>Thermobacterium acidophilum</i>	XVIII	<i>Streptococcus faecalis</i> R.....	XX

TABLEAU 13
Milieux purifiés pour la détermination de certaines vitamines B

MILIEUX	DESCRIPTION
XXI	Bacto-Thiamin Assay Medium*
XXII	Milieu XXI + 1 µg de thiamine par millilitre
XXIII	Bacto-Riboflavin Assay Medium*
XXIV	Milieu XXIII + 1 µg de riboflavine par millilitre
XXV	Bacto-Pantothenate Assay Medium*
XXVI	Milieu XXV + 1 µg de pantothénate de calcium par millilitre
XXVII	Bacto-Niacin Assay Medium*
XXVIII	Milieu XXVII + 1 µg d'acide nicotinique par millilitre

*Difco Laboratories Incorporated, Detroit, Michigan.

facteur *citrovorum* (Sauberlich et Bauman, 1948). Le Tableau 8 révèle sans équivoque que ces quatre milieux n'entretiennent pas une croissance satisfaisante. Aucun thermophile n'y peut croître; les autres espèces s'y multiplient très lentement. Ces milieux contiennent probablement des inhibiteurs, puisque la croissance est souvent inférieure à mesure qu'ils deviennent plus riches.

Nous avons donc préparé et essayé un nouveau milieu de base contenant de l'acide désoxyribonucléique et toutes les substances qui entrent dans la composition des milieux utilisés pour le dosage microbiologique des vitamines B. À ce

TABLEAU 14
Croissance des bactéries lactiques dans les milieux XXI à XXVIII

ESPÈCES BACTÉRIENNES*	MILIEUX							
	XXI	XXII	XXIII	XXIV	XXV	XXVI	XVII	XXVIII
<i>Thermobacterium</i>								
<i>yoghourtii</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Thermobacterium</i>								
<i>bulgaricum</i>	—	—	—	—	—	—	—	—
Bactéries du yoghourt....	+++*	+++*	—	—	—	—	—	—
<i>Streptococcus</i>								
<i>thermophilus</i>	+	+	+	+	—	+	—	+
<i>Streptococcus</i>								
<i>paracitrovorus</i>	+++	+++	—	+++	—	++	—	++
<i>Streptococcus</i>								
<i>cremoris</i>	+++	+++	—	+++	—	+	—	+
<i>Thermobacterium</i>								
<i>acidophilum</i>	+++	+++	+	+	—	—	—	—
<i>Lactobacillus casei</i>	+++	+++	—	+++	—	+	+	+++
<i>Propionibacterium</i>								
<i>shermanii</i>	+++	+++	+	+++	+	++	+	++
<i>Streptococcus lactis</i>	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+
<i>Streptococcus</i>								
<i>liquefaciens</i>	+++	+++	+	+++	+	+++	+	+
<i>Lactobacillus casei</i>								
ATCC 7469*....	+++	+++	—	+++	—	+++	—	+++
<i>Lactobacillus</i>								
<i>arabinosus</i> 17-5*....	+++	+++	+++	+++	—	+++	—	+++
<i>Streptococcus</i>								
<i>faecalis</i> R*....	+++	+++	+++	+++	+	++	+	++

*Trois souches à l'essai pour chaque espèce excepté les trois dernières espèces où une seule souche fut essayée.

**Une des trois souches n'a pas poussé.

Signification des symboles: +++ = croissance abondante
++ = croissance moyenne
+ = croissance médiocre
— = aucune croissance

milieu de base B, nous avons ajouté 5 ou 10% de sérum filtré. La composition du milieu de base B est donnée au Tableau 6, celle des milieux qu'il a servi à préparer au Tableau 7. Le Tableau 8 indique que ces milieux sont encore inférieurs aux milieux à base de milieu A.

Les revers essayés dans l'utilisation des milieux de base que nous avons préparés prouvent que nos connaissances de la nutrition des bactéries lactiques sont encore bien incomplètes et que les substances qui entrent dans la composition des milieux semi-synthétiques, de même que certains facteurs découverts récemment (facteurs *Lactobacillus bulgaricus* et *citrovorum*) ne suffisent pas à assurer la croissance. Nous savons, cependant, que le sérum filtré satisfait à toutes les exigences de ces microorganismes ; c'est de ce milieu que l'on réussira à isoler des facteurs encore inconnus. Nous avons donc pensé que le fractionnement du sérum filtré apporterait quelques indications sur la localisation et la nature de ce ou ces facteurs inconnus dans le lait ; les traitements appliqués au sérum filtré sont décrits au Tableau 9.

Le Tableau 11 indique que l'ultra-filtration du sérum (milieu XV) n'appauvrit pas le milieu en substances essentielles. D'autre part, l'adsorption sur Florisil (milieu XVI) annihile la croissance ; la riboflavine n'est pas seule en cause, cependant, puisque l'addition de 1 μ g de riboflavine par millilitre de

TABLEAU 15

*Acidité totale des milieux purifiés
après une semaine d'incubation**

ESPÈCES BACTÉRIENNES	BACTO-THIAMIN Assay Medium**	BACTO-RIBOFLAVIN Assay Medium**
Avant Inoculation	0.90	0.80
<i>Streptococcus paracitrovorus</i>	6.55***	—
<i>Streptococcus cremoris</i>	5.85	—
<i>Thermobacterium acidophilum</i>	10.90	2.00
<i>Lactobacillus casei</i>	20.85	—
<i>Propionibacterium shermanii</i>	7.55	3.70
<i>Streptococcus lactis</i>	8.87	6.40
<i>Streptococcus liquefaciens</i>	8.28	—
<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 7469	14.60	—
<i>Lactobacillus arabinosus</i> 17-5	20.30	10.80
<i>Streptococcus faecalis</i> R	11.10	7.40

*Nombre de millilitres de NaOH décimormal nécessaires pour neutraliser 9 millilitres de milieu à pH 7.

**Difco Laboratories Incorporated, Detroit, Michigan.

***Chaque résultat représente la moyenne de trois observations pour toutes les espèces, excepté les trois dernières où une seule souche fut mise à l'essai.

milieu (milieu XVII) n'entraîne pas une meilleure croissance. Avant d'arrêter notre choix sur le sérum filtré comme milieu d'inoculation, nous avons essayé trois autres milieux, de préparation plus facile et de composition plus uniforme. Il s'agit des milieux dont la composition apparaît au Tableau 10.

Le Tableau 11 indique toute la valeur des milieux XVIII et XX ; le milieu XIX n'est pas approprié. Le sérum filtré sera donc remplacé désormais par le "*Trypsin-Digest Broth*" et le "*Micro-Inoculum Broth*" (Difco Laboratories, 1953). Nous indiquons, au Tableau 12, le milieu d'inoculation désormais adopté pour chaque espèce bactérienne.

Milieu purifié. Le Tableau 13 donne la liste des milieux purifiés que nous avonsensemencés selon la procédure déjà décrite. Les souches qui croissent dans le milieu purifié enrichi de la vitamine à l'essai, mais non dans le milieu purifié, sont tributaires de cette vitamine ; celles qui croissent dans les deux milieux en sont indépendantes. Lorsque la croissance est nulle dans les deux cas, le milieu n'est pas approprié. Le Tableau 14 montre que la thiamine n'est pas essentielle pour les souches qui croissent dans le "*Bacto-Thiamin Assay Medium*" ; la riboflavine, dans des conditions analogues, est presque toujours essentielle. Quant aux milieux utilisés dans le dosage des acides pantothénique et nicotinique, ils n'entretiennent que rarement la croissance. Nous ne retiendrons donc, dans l'étude de la synthèse, que les milieux purifiés XXI et XXIII.

Synthèse de la thiamine et de la riboflavine en milieux purifiés. Les milieux purifiés XXI et XXIII sont reconstitués (Difco Laboratories, 1953), distribués en bouteilles de 250 ml à raison de 100 ml par bouteille et stérilisés à 121 C pendant 15 minutes. Les bouteilles sont refroidies à la température d'incubation appropriée. Un millilitre de suspension bactérienne sert d'inoculum à chaque bouteille. Toutes les bouteilles sont maintenues à la température optimum d'incubation pendant une semaine. La détermination de la thiamine ou de la riboflavine se fait après des périodes d'incubation de 24, 48 et 168 heures. Le dosage de l'acidité est pratiqué avant et après incubation (Tableau 15).

Aucune souche ne peut synthétiser la thiamine dans ce milieu et dans ces conditions. Quant à la riboflavine, elle n'est synthétisée qu'en très petites quantités, 0.1 μ g par millilitre, par les trois souches de *Streptococcus lactis* après 48 heures d'incubation ; durant les cinq jours suivants, la quantité de riboflavine n'augmente pas mais se maintient.

DISCUSSION

Synthèse de la thiamine. Les vingt-quatre souches de bactéries lactiques ensemencées dans un milieu complètement dépourvu de thiamine ont été incapables, durant une semaine d'incubation, d'accomplir la moindre synthèse de cette vitamine. Les bactéries peuvent pourtant croître normalement dans ce milieu purifié et elles ne sont aucunement tributaires de la thiamine. Si l'on admet que certaines de ces bactéries dégradent la plus grande partie des sucres en acide lactique et sont par conséquent homo-fermentatives, on comprend leur comportement normal en l'absence de la thiamine ; en effet, la cocarboxylase n'est pas nécessaire pour cette réduction de l'acide pyruvique. La thiamine n'est donc pas essentielle et sa synthèse est superflue chez ces bactéries.

L'acidité (Tableau 15), mesurée après une semaine d'incubation, est très élevée chez *L. casei*, *T. acidophilum*, *L. casei* ATCC 7469, *L. arabinosus* 17-5 et *S. lactis* R. L'acidité est moins grande chez les autres bactéries hétéro-fermentatives. Chez ces dernières, on s'attend à ce que la thiamine soit nécessaire, car une partie de l'acide pyruvique subit la décarboxylation. Il serait intéressant de rechercher si la thiamine est utilisée et si elle peut être synthétisée à partir de ses parties thiazole et pyrimidine.

Une autre hypothèse est plausible. On sait que la réponse bactérienne peut varier selon la complexité du milieu d'inoculation. Généralement, plus le milieu est complet, plus les exigences sont marquées lors du repiquage suivant. Il y aurait donc avantage à poursuivre l'étude physiologique de ces bactéries et d'en déterminer précisément les exigences nutritives. Un milieu synthétique en résulterait et la croissance des bactéries pourrait s'apprécier en regard de la complexité du milieu d'inoculation.

Il faut remarquer que ces résultats pourraient différer si l'on employait un autre milieu purifié. En effet, les trois bactéries-tests synthétisent la thiamine (Peterson et Peterson, 1945). Dans le "*Bacto-Thiamin Assay Medium*", nous n'avons pas pu nous rendre compte de cette synthèse.

Synthèse de la riboflavine. Des onze souches de bactéries ensemencées dans un milieu purifié en riboflavine, trois seulement ont pu accomplir une légère synthèse. Ces trois souches appartiennent à l'espèce *Streptococcus lactis*, la seule espèce d'ailleurs, en outre de *L. arabinosus* 17-5, qui croît convenablement dans ce milieu. En effet, l'examen du Tableau 15 indique chez les autres une acidité très basse et une pauvre utilisation des sucres. Ces bactéries ne peuvent d'ailleurs pas subir l'épreuve des cinq repiquages consécutifs dans le "*Bacto-Riboflavin Assay Medium*" ; un fait remarquable est que les cellules lavées troublent rapidement le milieu purifié lors du premier repiquage. Le Tableau 15 révèle aussi chez *S. lactis* et *L. arabinosus* 17-5 une acidité plus faible dans ce milieu que dans le "*Bacto-Thiamin Assay Medium*". Ce dernier contient, il est vrai, une quantité de sucre deux fois plus grande. *S. lactis* et *L. arabinosus* 17-5 ne synthétisent que la quantité de vitamine nécessaire à leur métabolisme.

CONCLUSION

Les milieux synthétiques et semi-synthétiques utilisés pour le dosage microbiologique des vitamines ne favorisent pas la croissance normale des bactéries lactiques que nous avons étudiées. Le lait et le sérum de lait ont une influence décisive sur la croissance de ces bactéries, les thermophiles surtout. Ces milieux ne répondent pas, cependant, aux exigences de ces études de synthèse ; aussi fut-il nécessaire d'adopter deux autres milieux d'inoculation.

Les bactéries lactiques cultivées dans des milieux, purifiés respectivement en thiamine et en riboflavine, peuvent se passer de ces vitamines, mais sont quand même incapables de les synthétiser. Ces résultats ne sont pas absolus, cependant, puisque la faible acidité qui se développe dans certains cas laisse croire que les organismes sont troublés dans leur croissance et que le milieu n'est pas satisfaisant.

Des connaissances plus approfondies de leurs exigences nutritives permettront peut-être de préparer un milieu synthétique complet qu'il sera facile de purifier en tel ou tel facteur de croissance. Ce n'est qu'alors que nous pourrions expliquer les résultats antérieurs sur l'influence des bactéries lactiques sur la teneur vitaminique du lait.

BIBLIOGRAPHIE

- ASSOCIATION OF VITAMIN CHEMISTS, Inc. (The) 1951 *Methods of Vitamin Assay*. 2^e édition. Interscience Publishers.
- CHELDELIN, V. H., et KING, T. E. 1953 Nutrition of microorganisms. Dans *Ann. Rev. Microbiol.*, 7, 113-142. Édité par C. E. Clifton. Annual Reviews, Inc., Stanford, California.
- COLLINS, E. B., NELSON, F. E., et PARMELEE, C. E. 1950 Acetate and oleate requirements of the lactic group of streptococci. *J. Bacteriol.*, 59, 69-74.
- DIFCO LABORATORIES, Inc. 1953 *Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents*. 10^e édition. Detroit, Michigan.
- GUIRARD, B. M. 1958 Microbial nutrition. Dans *Ann. Rev. Microbiol.*, 12. Édité par C. E. Clifton. Annual Reviews, Inc., Stanford, California.
- HENDLIN, D. 1954 The nutrition of microorganisms. Dans *Ann. Rev. Microbiol.*, 8, 47-70. Édité par C. E. Clifton. Annual Reviews, Inc., Stanford, California.
- HOFF-JØRGENSEN, E., WILLIAMS, W. L., et SNELL, E. E. 1947 *J. Biol. Chem.*, 168, 773.
- KITAY, Estelle, McNUTT, W. S., et SNELL, E. E. 1950 Deoxyribosides and vitamin B₁₂ as growth factors for lactic acid bacteria. *J. Bacteriol.*, 59, 727-738.
- MAGASANIK, B. 1957 Nutrition of bacteria and fungi. Dans *Ann. Rev. Microbiol.*, 11, 221-252. Édité par C. E. Clifton, Annual Reviews, Inc., Stanford, California.
- McNUTT, W. S., et SNELL, E. E. 1950 Pyridoxal phosphate and pyridoxamine phosphate as growth factors for lactic acid bacteria. *J. Biol. Chem.*, 182, 557-567.

- PADER, M. 1943 Recovery of solvents used in the chemical determination of thiamin. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **16**, 116.
- PETERSON, W. H., et PETERSON, M. S. 1945 Relation of bacteria to vitamins and other growth factors. *Bacteriol. Rev.*, **9**, 49.
- SARETT, M., et CHELDELIN, V. H. 1944 *J. Biol. Chem.*, **155**, 153.
- SAUBERLICH, H. E., et BAUMAN, C. A. 1948 A factor required for the growth of *Leuconostoc citrovorum*. *J. Biol. Chem.*, **176**, 165-173.
- SHORB, Mary S. 1948 Activity of vitamin B₁₂ for the growth of *Lactobacillus lactis*. *Science*, **107**, 397.
- SNELL, E. E. 1951 Bacterial nutrition, Chemical factors. Dans *Bacterial Physiology*. Edité par C. Werkman et P. W. Wilson. Academic Publ., New York.
- SNELL, E. E., KITAY, Estelle, et HOFF-JØRGENSEN, E. 1948 *Arch. Biochem.*, **18**, 495.
- STOCKSTAD, E. L. R., BROQUIST, H. P., et SLOANE, N. H. 1955 Nutrition of microorganisms. Dans *Ann. Rev. Microbiol.*, **9**, 111-144. Edité par C. E. Clifton. Annual Reviews, Inc., Stanford, California.
- WILLIAMS, W. L., BROQUIST, H. P., et SNELL, E. E. 1947 *J. Biol. Chem.*, **170**, 619.
- WILLIAMS, W. L., HOFF-JØRGENSEN, E., et SNELL, E. E. 1949 Determination and properties of an unidentified growth factor required by *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Biol. Chem.*, **177**, 933-940.
- WRIGHT, L. D. 1956 Nutrition of bacteria and fungi. Dans *Ann. Rev. Microbiol.*, **10**, 141-172. Edité par C. E. Clifton, Annual Reviews, Inc., Stanford, California.
-

and the other side of the mountain is the same as the other side of the mountain.

The mountain is the same as the other side of the mountain.

The mountain is the same as the other side of the mountain.

The mountain is the same as the other side of the mountain.

The mountain is the same as the other side of the mountain.

The mountain is the same as the other side of the mountain.

The mountain is the same as the other side of the mountain.

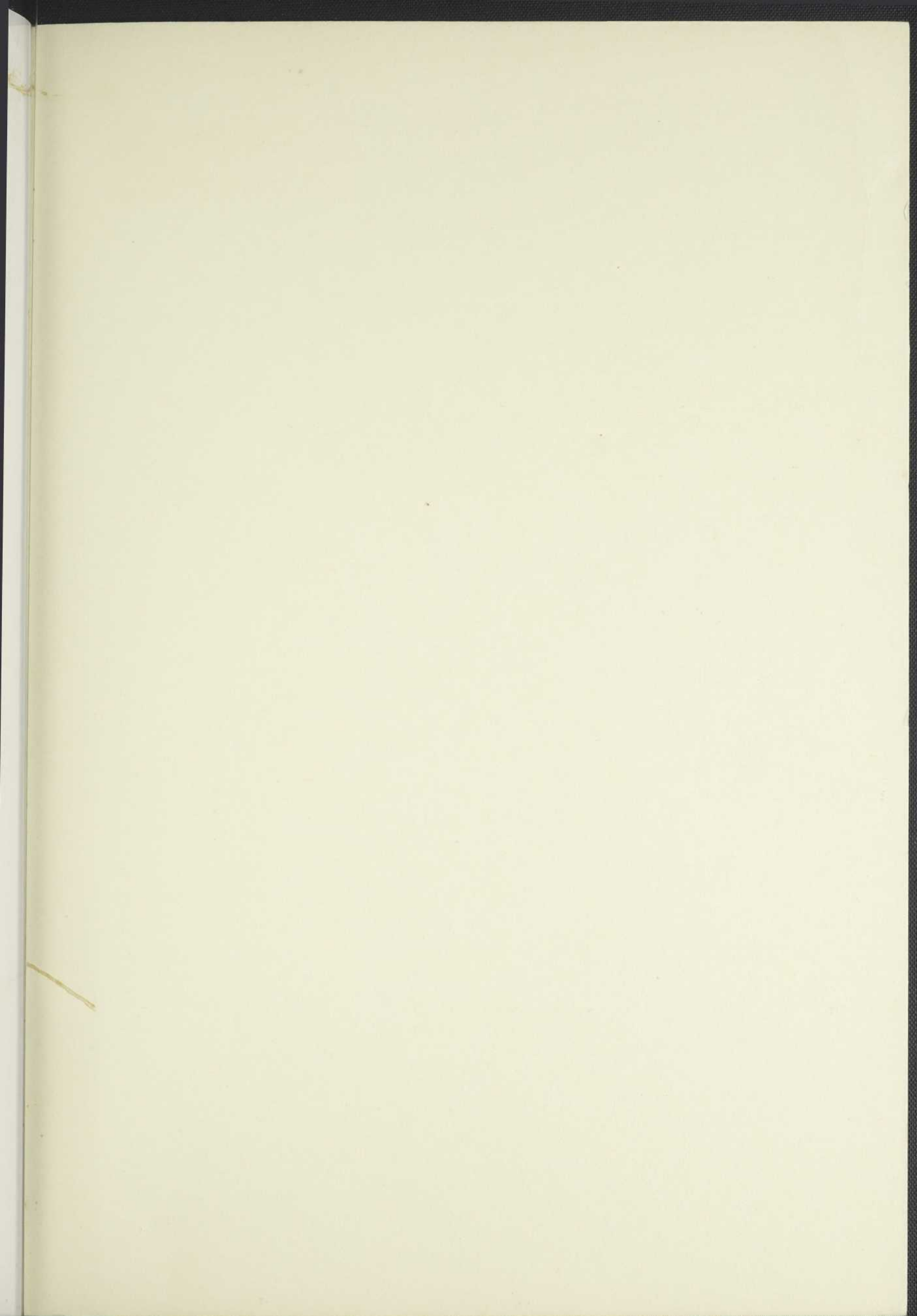
The mountain is the same as the other side of the mountain.

The mountain is the same as the other side of the mountain.

The mountain is the same as the other side of the mountain.

The mountain is the same as the other side of the mountain.





BNQ



000 194 207