



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2007/02/19
 (87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2007/08/30
 (85) Entrée phase nationale/National Entry: 2008/08/19
 (86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2007/000294
 (87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2007/096510
 (30) Priorités/Priorities: 2006/02/20 (EP06290286.1);
 2006/02/21 (US60/774,654)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 1/20* (2006.01),
A23C 9/123 (2006.01), *A61K 35/74* (2006.01),
C12N 15/01 (2006.01)

(71) Demandeur/Applicant:
 COMPAGNIE GERVAIS DANONE, FR

(72) Inventeurs/Inventors:
 GARAULT, PEGGY, FR;
 DRUESNE, ANNE, FR;
 FAURIE, JEAN-MICHEL, FR;
 QUEGUINER, CLAIRE, FR;
 SAINT DENIS, THIERRY, FR;
 SMOKVINA TAMARA, FR

(74) Agent: OGILVY RENAULT LLP/S.E.N.C.R.L.,S.R.L.

(54) Titre : SOUCHES DE LACTOBACILLUS HELVETICUS NE FERMENTANT PAS LE LACTOSE
 (54) Title: STRAINS OF LACTOBACILLUS HELVETICUS WHICH DO NOT FERMENT LACTOSE

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne de nouvelles souches de *Lactobacillus helveticus*. Plus particulièrement, la présente invention propose des souches de *Lactobacillus helveticus* possédant un phénotype lactose moins, et leurs applications dans l'industrie agro-alimentaire. La présente invention concerne également un procédé d'obtention de telles souches de *Lactobacillus helveticus*.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
30 août 2007 (30.08.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/096510 A3(51) Classification internationale des brevets :
C12N 1/20 (2006.01) A23C 9/123 (2006.01)
C12N 15/01 (2006.01) A61K 35/74 (2006.01)(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2007/000294(22) Date de dépôt international :
19 février 2007 (19.02.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
06290286.1 20 février 2006 (20.02.2006) EP
60/774,654 21 février 2006 (21.02.2006) US(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : COM-
PAGNIE GERVAIS DANONE [FR/FR]; 17 boulevard
Haussmann, F-75009 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : GA-
RAULT, Peggy [FR/FR]; 14 rue des Grandes Vignes,
F-91310 Monthery (FR). DRUESNE, Anne [FR/FR]; 8,
Impasse du Fer à Cheval, F-91190 VILLIERS LE BACLE
(FR). FAURIE, Jean-Michel [FR/FR]; 3 rue Lamartine,
F-78350 JOUY-EN-JOSAS (FR). QUEGUINER, Claire
[FR/FR]; 113 Avenue Gabriel Péri, F-92260 FONTENAY
AUX ROSES (FR). SAINT DENIS, Thierry [FR/FR];
37 rue Charles Silvestri, F-94300 VINCENNES (FR).
SMOKVINA Tamara [FR/FR]; 7 Domaine du Séquoia,
F-91400 ORSAY (FR).(74) Mandataires : BOULINGUIEZ, Didier etc.; Cabinet
Plasseraud, 52, rue de la Victoire, F-75440 PARIS CEDEX
09 (FR).(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP,
KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ,
NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Déclaration en vertu de la règle 4.17 :

— relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv))

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 13 décembre 2007En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: STRAINS OF LACTOBACILLUS HELVETICUS WHICH DO NOT FERMENT LACTOSE

(54) Titre : SOUCHES DE LACTOBACILLUS HELVETICUS NE FERMENTANT PAS LE LACTOSE

(57) Abstract: The invention relates to novel strains of *Lactobacillus helveticus*. More specifically, the invention relates to strains of *Lactobacillus helveticus* having a lactose-negative phenotype and to the uses thereof in the agri-food industry. The invention also relates to a method for obtaining such strains of *Lactobacillus helveticus*.(57) Abrégé : La présente invention concerne de nouvelles souches de *Lactobacillus helveticus*. Plus particulièrement, la présente invention propose des souches de *Lactobacillus helveticus* possédant un phénotype lactose moins, et leurs applications dans l'industrie agro-alimentaire. La présente invention concerne également un procédé d'obtention de telles souches de *Lactobacillus helveticus*.

WO 2007/096510 A3

Nouvelles souches de *Lactobacillus helveticus*

La présente invention concerne de nouvelles souches de *Lactobacillus helveticus*, ainsi que leurs applications dans le domaine agro-alimentaire. Plus particulièrement, la présente invention propose des souches de *Lactobacillus helveticus* possédant un phénotype lactose moins. La présente invention concerne également un procédé d'obtention de telles souches de *Lactobacillus helveticus*.

L'hypertension touche une part importante de la population. L'utilisation du peptide VPP (Val Pro Pro) et de peptides contenant la séquence VPP comme agents capables de réduire la pression artérielle par inhibition de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) a été décrite dans EP 0 583 074. Un effet similaire du tripeptide IPP (Ile Pro Pro) a été également décrit dans la littérature. Ces peptides inhibent l'ACE en bloquant son site actif et l'empêchent ainsi de rendre active l'angiotensine.

Il est connu que les deux séquences VPP et IPP sont présentes dans la caséine Béta bovine et que l'hydrolyse adéquate de cette caséine (ou plus généralement du lait qui la contient) permet d'obtenir lesdits tripeptides. De nombreuses études chez l'animal et chez l'homme ont montré que l'ingestion journalière de quelques milligrammes de ces tripeptides permet de réduire efficacement la pression artérielle, en particulier chez les sujets hypertendus, réduisant d'autant le risque d'accident cardio-vasculaire.

Des peptides issus d'un lait fermenté par des *Lactobacillus helveticus* ont montré in vivo leur effet inhibiteur de l'ACE (ACEI) et ces peptides ont pu être retrouvés au niveau de l'aorte des rats ayant participé à l'étude (Masuda O. et al., 1996. J. Nutr. 126, 3063-8). D'autres études ont aussi montré plus spécifiquement une diminution de la pression artérielle chez des rats hypertendus suite à l'ingestion de peptides issus d'un lait fermenté par des *L. helveticus* (Yamamoto N. et al., 1994. Biosci. Biotech. Biochem. 58, 776-8).

Chez l'Homme, le même lait fermenté a aussi permis de diminuer la pression artérielle systolique (Hata . et al. ; 1996. Am. J. Clin. Nutr., 64, 767-71). Une étude plus récente confirme que les peptides présents dans le produit AMEAL S ® commercialisé par la société CALPIS réduisent de manière significative la pression artérielle chez des sujets ayant une pression artérielle supérieure à la normale (Mizuno et al., 2005. British Journal of Nutrition ; vol 94, issue 1, 84-91).

Dans une autre étude récente (Jauhiainen et al. ; 2005. Am. J. of Hypertension, 18 : 1600-1605) est émise l'hypothèse selon laquelle le mécanisme d'action ci-dessus cité (inhibition de l'ACE) pour expliquer l'effet antihypertenseur d'un lait fermenté par un *L. helveticus* pourrait cependant ne pas être le mécanisme d'action déterminant chez l'homme.

Une grande majorité des *Lactobacillus helveticus* est capable de produire les tripeptides IPP et VPP par fermentation de lait, mais les quantités produites peuvent être variables. EP 1 016 709 décrit un moyen de produire les tripeptides VPP et IPP par fermentation de lait à l'aide de souches de bactéries lactiques spécifiques appartenant à l'espèce *Lactobacillus helveticus*. Toutefois, le produit ainsi fabriqué (lait fermenté) contient une très grande quantité d'acide lactique, et est donc caractérisé par une acidité inacceptable du point de vue sensoriel et gustatif. En outre se pose le problème de la post-acidification : même si la fermentation est arrêtée (classiquement par refroidissement) à des pH organoleptiquement acceptables (pH > 4), l'acidification se poursuit à froid du fait des propriétés intrinsèques des *Lactobacillus helveticus*. Ceci conduit à une chute du pH du produit, qui devient tout aussi inacceptable à consommer.

Afin d'éviter la post-acidification, il est possible d'arrêter la fermentation à un pH acceptable en tuant immédiatement la souche par traitement thermique (pasteurisation, thermisation) : la post-acidification est alors nulle (l'acidité du produit n'évolue plus pendant sa conservation). Malheureusement, la quantité de tripeptides est réduite du fait de l'arrêt précoce de la fermentation. Les produits ainsi obtenus n'ont alors que des teneurs faibles en IPP et VPP. Il est également possible de fermenter le lait par la même souche jusqu'à obtenir une concentration maximale en tripeptides. La grande quantité d'acide lactique générée en parallèle doit alors

être retirée par un procédé multi étapes complexe et coûteux. En outre, le procédé n'est pas « naturel », car il fait intervenir des étapes de séparation. Un tel procédé n'est ainsi pas adapté à l'échelle industrielle.

5 La présente invention propose des solutions aux inconvénients de l'état de la technique. En particulier, la présente invention propose des souches de *Lactobacillus helveticus* permettant la préparation de produits alimentaires, notamment des produits laitiers fermentés, possédant de nombreuses propriétés avantageuses:

- 10 - Les produits laitiers selon l'invention ont une acidité parfaitement contrôlée, non seulement en fin de fermentation, mais également au stockage. En particulier, ils ne sont pas sujets au phénomène de post-acidification. Ainsi, les produits laitiers selon l'invention sont organoleptiquement très satisfaisants.
- 15 - Les produits laitiers selon l'invention sont directement consommables comme probiotiques, c'est-à-dire qu'ils contiennent une quantité significative de bactéries vivantes, sans aucun impact sur leurs qualités gustatives, et notamment, sans aucun impact sur leur acidité.
- 20 - La préparation des produits selon l'invention ne nécessite aucune étape de thermisation, ni aucune étape complexe de purification. Les procédés selon l'invention peuvent ainsi être mis en œuvre de manière simple, dans des installations de laiterie classique, sans modification importante de l'équipement. Par ailleurs, les procédés selon l'invention sont entièrement naturels.
- 25 - Les produits alimentaires, notamment laitiers, selon l'invention peuvent contenir de très fortes teneurs en tripeptides VPP et IPP, et ceci, avec des ratios élevés de (IPP+VPP) / (acide lactique). Ces résultats peuvent être obtenus sans étape de purification ou de concentration préalable.
- Les produits alimentaires, notamment laitiers, selon l'invention contiennent avantageusement une biomasse importante (i.e une concentration importante de micro-organismes vivants).

Par souche, on entend, au sens de la présente invention, toute culture, généralement pure, d'un micro-organisme, obtenue à partir d'une seule cellule ou d'une colonie isolée.

5 Par variant ou mutant d'une souche X, on entend désigner, au sens de la présente invention, toute souche obtenue à partir d'une souche de référence X. Dans le présent contexte, on utilisera plus particulièrement les termes « variant » pour désigner une souche obtenue principalement par mutation et sélection à partir d'une souche de référence X et « mutant » pour désigner plus spécifiquement une souche obtenue par des techniques de mutagénèse aléatoire ou dirigée (par exemple
10 transformation génétique à l'aide de vecteurs), appliquées à la souche X.

Les mutants ou variants des souches selon la présente invention seront bien entendus concernés par la protection conférée par ce brevet à partir du moment où ils conservent les aspects essentiels de l'invention, notamment le phénotype lactose moins.

15 Par souche à « phénotype lactose moins », on entend toute souche n'ayant pas la capacité à transformer le lactose en acide lactique.

Par souche à « phénotype fructose moins », on entend toute souche n'ayant pas la capacité à métaboliser le fructose.

20 Par milieu laitier, on entend tout milieu contenant des protéines de lait, par exemple un lait bovin standardisé à 4% en protéines avec de la poudre de lait bovin (écrémé ou non) ou avec du lait concentré.

Par produit laitier, au sens de la présente invention, on entend, en plus du lait, tout produit dérivé du lait, tel la crème, la crème glacée, le beurre, le fromage, le yogourt, le lait fermenté; les produits secondaires, comme le lactosérum, la caséine
25 ainsi que divers aliments préparés contenant comme ingrédient principal du lait ou des constituants du lait. Parmi les produits laitiers, les produits laitiers fermentés comprennent entre autres les yaourts, les laits fermentés, les fromages blancs, les kéfirs, les fromages, les produits laitiers probiotiques et plus généralement tout produit laitier qui a subi au moins une étape de fermentation. Ledit lait est
30 généralement du lait de vache, mais peut également être du lait d'autres mammifères, comme la chèvre, la brebis, la jument, la chamelle, la bufflonne.

Par produit alimentaire, au sens de la présente invention, on entend tout produit destiné à la nutrition humaine ou animale. En particulier, les produits alimentaires comprennent des produits destinés à l'alimentation des nourrissons, des enfants, des adolescents, et des adultes. Les produits alimentaires selon l'invention peuvent
5 contenir en tout ou partie, au moins un produit laitier fermenté selon l'invention. Les produits alimentaires selon l'invention peuvent également contenir d'autres ingrédients habituellement utilisés dans l'industrie agroalimentaire, tels que des additifs, des conservateurs, des fruits ou extraits de fruits, des arômes, des colorants, des agents de texture, des céréales, des morceaux de chocolat, etc.

10 Par ferment, on entend, au sens de la présente invention, toute composition contenant au moins une souche vivante de micro-organisme susceptible de fermenter un milieu donné. Parmi les ferments, les ferments lactiques sont des compositions contenant au moins une souche vivante de micro-organisme susceptible de fermenter un milieu laitier.

15 Selon un mode de réalisation, la présente invention concerne une souche de *Lactobacillus helveticus* n'ayant pas la capacité à transformer le lactose en acide lactique. La présente invention concerne également une souche de *Lactobacillus helveticus* n'ayant pas la capacité à transformer le lactose en acide lactique, et
20 possédant au moins une mutation dans l'opéron lactose.

Selon un mode de réalisation, ladite mutation dans l'opéron lactose est une mutation ponctuelle introduisant un codon stop. Selon un mode de réalisation encore plus préférentiel, ladite mutation ponctuelle introduisant un codon stop est située dans le gène lacL de l'opéron lactose. Par mutation ponctuelle, on entend toute substitution
25 de nucléotide intervenant dans la séquence, par comparaison à une séquence dite « de type sauvage ». L'homme du métier sait identifier un codon stop (également appelé codon non-sens), et qui correspond généralement en termes d'ARNm à l'un des triplets : UAA, UAG, UGA.

30 Ainsi, les souches *Lactobacillus helveticus* selon l'invention n'ont pas la capacité de dégrader le lactose (pas de transformation du lactose en acide lactique). En effet, les souches selon l'invention ont un phénotype lactose moins. En revanche, elles sont

capables de croître en présence de glucose comme source de carbone (fermentation du glucose en acide lactique), et de métaboliser certains composants du lait, notamment les protéines.

5 Ainsi, les souches selon l'invention permettent avantageusement une fermentation à pH entièrement contrôlé : le pH final après fermentation est parfaitement maîtrisé selon la quantité de glucose initialement contenue dans le milieu de fermentation. Ceci résulte du fait qu'une quantité donnée de glucose résulte de manière quasiment stoechiométrique en la même quantité d'acide lactique. Par ailleurs, l'emploi des souches selon l'invention évite tout phénomène de post-acidification. Ainsi, grâce
10 aux souches selon l'invention, il est possible d'obtenir des produits alimentaires particulièrement satisfaisants sur le plan organoleptique.

De manière avantageuse, selon un mode de réalisation, les souches de *Lactobacillus helveticus* selon l'invention sont telles qu'un milieu laitier à 4,0% de protéines
15 totales contenant 1,0 % (p/p) de glucose fermenté par lesdites souches de *Lactobacillus helveticus* pendant un temps maximal de fermentation de 30h, à une température entre 30 et 45°C, possède un pH supérieur ou égal à 4,0 ; préférentiellement supérieur ou égal à 4,1 ; préférentiellement supérieur ou égal 4,2 ; préférentiellement supérieur ou égal à 4,3 ; préférentiellement supérieur ou
20 égal à 4,5.

Cet avantage est donc particulièrement marqué dans le cas de souches de *Lactobacillus helveticus* hyperproductrices en tripeptides IPP et/ou VPP : il n'est absolument pas requis de choisir un compromis entre

- une forte production en tripeptides lors de la fermentation (nécessitant un
25 temps de fermentation aussi long que possible), et
- des propriétés organoleptiquement acceptables (nécessitant une acidification limitée, et donc, non seulement un temps de fermentation aussi court que possible, afin de limiter la production d'acide lactique par fermentation, mais également une thermisation/pasteurisation afin d'éviter le phénomène de
30 post-acidification).

En effet, avantageusement selon la présente invention, la production de tripeptides VPP et/ou IPP, et la production d'acide lactique sont partiellement découplées : la production d'acide lactique n'est que fonction de la quantité de glucose initialement présente dans le milieu de fermentation, et non plus fonction du temps de fermentation.

Un moyen d'exprimer la concentration en tripeptides de manière simple est de l'exprimer en concentration équivalent VPP [VPPEq].

On l'exprime en mg/kg : $[VPPEq] = [VPP] + (9/5 \times [IPP])$

10 Ainsi, selon un mode de réalisation, les souches de *Lactobacillus helveticus* selon l'invention sont avantageusement capables, par fermentation de produire les tripeptides de séquence IPP et/ou VPP en une quantité d'au moins 25 mg, préférentiellement au moins 30 mg, préférentiellement au moins 35 mg, préférentiellement au moins 40 mg, préférentiellement au moins 45 mg, 15 préférentiellement au moins 50 mg, préférentiellement au moins 55 mg, préférentiellement au moins 60 mg, préférentiellement au moins 65 mg, préférentiellement au moins 70 mg, préférentiellement au moins 75 mg, plus préférentiellement au moins 80 mg de VPPEq par kg de produit fermenté. De telles quantités de VPP et/ou IPP sont généralement obtenues par fermentation par une 20 souche selon l'invention à une température entre 30 et 45°C, préférentiellement entre 31 et 44°C, préférentiellement entre 32 et 43°C, préférentiellement entre 33 et 42°C, préférentiellement entre 34 et 41°C, préférentiellement entre 35 et 40°C, et plus préférentiellement à 37°C, d'un milieu laitier contenant une quantité de glucose supérieure à 3% (p/p) et avec une teneur totale en protéines supérieure ou égale à 25 2% (p/p), préférentiellement entre 2 et 10% (p/p), plus préférentiellement entre 2,5 et 6% (p/p) et encore plus préférentiellement égale à 4% (p/p),

Selon un mode de réalisation, les souches de *Lactobacillus helveticus* selon l'invention possèdent en outre un phénotype fructose moins. La combinaison des phénotypes lactose moins et fructose moins est particulièrement avantageuse. En effet, le fructose a un fort pouvoir sucrant, et est un ingrédient utile dans les produits 30 alimentaires. Ainsi, si le fructose ne peut être dégradé par la souche de *Lactobacillus*

helveticus, le produit alimentaire conserve d'excellentes propriétés organoleptiques. De plus, une souche à la fois lactose moins et fructose moins ne pourra pousser que dans un milieu contenant du glucose. Ainsi, le pH final sera avantageusement mieux contrôlé dans le cas où le produit alimentaire contient une préparation de fruit(s),
5 notamment des morceaux et/ou du jus de fruit(s).

Selon un mode de réalisation, la souche selon l'invention est choisie parmi:

I-3504 déposée à la CNCM le 14/10/05 ;

I-3505 déposée à la CNCM le 14/10/05 ;

I-3508 déposée à la CNCM le 14/10/05 ;

et les souches variantes ou mutantes dérivées de celles-ci.

Selon un autre mode de réalisation, la présente invention concerne l'utilisation d'une souche de *Lactobacillus helveticus* selon l'invention, pour la préparation d'un
10 produit alimentaire ou pharmaceutique, notamment d'un produit laitier fermenté.

De manière avantageuse, selon un aspect de l'invention, ledit produit alimentaire ou pharmaceutique possède des propriétés anti-hypertensives.

La présente invention concerne également un produit alimentaire, notamment produit laitier fermenté, comprenant au moins une souche de *Lactobacillus*
15 *helveticus* selon l'invention.

De manière avantageuse, selon un mode de réalisation, ledit produit alimentaire contient au moins 10^6 , préférentiellement au moins 10^7 , préférentiellement au moins 10^8 UFC/mL de bactéries *Lactobacillus helveticus* vivantes. Ainsi, le produit alimentaire selon l'invention contient une importante biomasse.

20 Selon un mode de réalisation, ledit produit alimentaire contient au moins 25 mg, préférentiellement au moins 30 mg, préférentiellement au moins 35 mg, préférentiellement au moins 40 mg, préférentiellement au moins 45 mg, préférentiellement au moins 50 mg, préférentiellement au moins 55 mg, préférentiellement au moins 60 mg, préférentiellement au moins 65 mg,
25 préférentiellement au moins 70 mg, préférentiellement au moins 75 mg, plus préférentiellement au moins 80 mg de VPPEq par kg de produit alimentaire.

Selon un mode de réalisation, le produit alimentaire selon l'invention comprend en outre des préparations de fruit(s), notamment des morceaux et/ou du jus de fruit(s).

Selon un mode de réalisation, le produit alimentaire selon l'invention possède un pH supérieur ou égal à 3,85 ; préférentiellement supérieur ou égal à 3,90 ; préférentiellement supérieur ou égal à 3,95 ; préférentiellement supérieur ou égal à 4,00 ; préférentiellement supérieur ou égal à 4,05 ; préférentiellement supérieur ou égal à 4,10 ; préférentiellement supérieur ou égal à 4,15 ; plus préférentiellement supérieur ou égal à 4,20.

Avantageusement selon un mode de réalisation, le produit alimentaire selon l'invention possède des propriétés anti-hypertensives.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne un procédé de préparation d'un produit alimentaire.

Selon un mode de réalisation, ledit procédé comprend les étapes suivantes :

- sélectionner une matière première contenant des protéines de lait, notamment des protéines contenant les séquences peptidiques IPP et/ou VPP. Ce peut par exemple être du lait contenant 2-10% (p/p) de protéines totales.
- sélectionner au moins une souche *Lactobacillus helveticus* selon l'invention,
- ensemercer ladite matière première avec ladite souche,
- fermenter ladite matière première en présence de 1-3% (p/p) de glucose pendant 12-30 heures à 30-45°C, et en présence de ladite souche.

Selon un mode de réalisation, le procédé selon l'invention est avantageusement dépourvu de toute étape de thermisation après fermentation. Ceci permet de conserver des bactéries vivantes dans le produit alimentaire (probiotique).

Selon un mode de réalisation, la présente invention concerne une utilisation de streptozotocine pour l'obtention de souches *Lactobacillus helveticus* possédant un phénotype lactose moins.

La présente invention fournit également un procédé d'obtention de telles souches de *Lactobacillus helveticus*.

Selon un mode de réalisation, ledit procédé d'obtention de souches *Lactobacillus helveticus* possédant un phénotype lactose moins, comprenant les étapes suivantes :

- fournir au moins une souche de *Lactobacillus helveticus* ;
- mettre en contact ladite au moins une souche avec une quantité efficace de streptozotocine en présence de lactose ;
- isoler la ou les colonies de phénotype lactose moins.

5 La population de cellules de *Lactobacillus helveticus* capable de survivre en présence de streptozotocine est en effet avantageusement extrêmement enrichie en cellules lactose moins.

Selon un mode de réalisation, une étape de test colorimétrique sur un milieu contenant du Xgal et/ou du Sgal et/ou tout autre composé lié par une liaison β -galactosidique à du galactose et qui devient repérable suite à la rupture de cette
10 liaison par le microorganisme, est ajoutée au-dit procédé d'obtention de souches selon l'invention. L'IPTG peut être également ajouté pour réaliser ce test puisque ce composé agira comme un inducteur du transporteur du lactose ou comme un inducteur de l'utilisation du lactose par le microorganisme.

15

A titre d'exemple, ledit procédé peut être conduit de la manière suivante :

- 1er repiquage des souches *Lactobacillus helveticus* de départ (souches mères), sur bouillon MRS (Man Rogosa Sharp) neutre, la nuit à 35-40°C ;
- 2ème repiquage dans du MRS neutre.
- 20 - Incubation jusqu'à obtention d'une biomasse suffisante, par exemple 10-30h à 35-40°C.
- Ensemencement de MRS contenant une concentration de lactose permettant d'obtenir une biomasse suffisante, par exemple 2-7% (p/p) ; incubation avec suivi de la DO à 580nm.
- 25 - La streptozotocine est préparée extemporanément, et est ajoutée en cours de fermentation, de façon à avoir une concentration finale qui est bactéricide pour la souche considérée. Cette concentration est souche-dépendante.
- Après incubation à 35-40°C, les cultures sont lavées deux fois avec du tryptone sel.
- 30 - Les culots sont repris dans du tryptone sel, puis des bouillons de MRSneutre sont remis en culture

- Incubation à 35-40°C, jusqu'à ce qu'il y ait croissance de la souche.
- Des isolements sont ensuite réalisés sur MRSneutre + Xgal + IPTG , puis incubés à 35-40°C sous CO₂. Cette étape est un test colorimétrique permettant de déterminer si une souche bactérienne est lactose plus ou lactose moins : Si la souche est capable d'utiliser le lactose comme source de carbone, il y a production d'une substance bleue, la colonie sera donc bleue et dans le cas contraire (souche lactose moins), elle sera blanche.
- Les colonies blanches sont repiquées sur MRSneutre et incubées à 35-40°C.

10 L'invention sera davantage décrite à l'aide des exemples suivants, qui sont non-limitatifs.

EXEMPLES DE REALISATION

15 **EXEMPLE 1 : obtention de souches possédant un phénotype lactose moins**

Matériel et méthodes

Souches de départ (souches dites « mères »)

I-3431	déposée à la CNCM le 25/05/05
I-3434	déposée à la CNCM le 25/05/05
I-3435	déposée à la CNCM le 25/05/05

Test de sensibilité à la streptozotocine

20 Dans un premier temps, il est vérifié que les souches mères sont sensibles à l'antibiotique utilisé, la streptozotocine. La densité optique (DO) à 580nm est suivie sur des cultures à 42°C en bouillon MRS (Man Rogosa Sharp) neutre. Lorsque celle-ci atteint 0,1, la streptozotocine est ajoutée dans un tube afin d'avoir 50µg/ml au final (par exemple 100µl d'une solution à 5mg/ml pour 10ml de milieu).

Sélection de souches lactose moins

25 Les étapes suivantes sont réalisées afin d'obtenir des souches *Lactobacillus helveticus* lactose moins :

- 1er repiquage des souches *Lactobacillus helveticus* de départ (souches mères) à partir des cupules du stock de travail, sur bouillon MRS neutre, la nuit à 37°C ;

- 2ème repiquage à 1% dans du MRS neutre.
 - Incubation 16h à 37°C.
 - Ensemencement de 10ml de MRS à 5% (p/p) de lactose, à 1% et incubation à 40°C avec suivi de la DO à 580nm.
- 5
- La streptozotocine est préparée extemporanément, et est ajoutée au bout de 2h15 ou de 4h de fermentation, de façon à avoir une concentration finale de 50µg/ml.
 - Après les 7h30 d'incubation à 40°C, les cultures sont lavées deux fois avec du tryptone sel.
 - Les culots sont repris dans 2 ml de tryptone sel, puis des bouillons de MRSneutre
- 10
- sont ensemencés à 10%.
 - Incubation à 37°C, jusqu'à ce qu'il y ait croissance de la souche.
 - Des isollements sont ensuite réalisés sur MRSneutre + Xgal + IPTG , puis incubés à 37°C sous CO₂. Cette étape est un test colorimétrique permettant de déterminer si
- 15
- une souche bactérienne est lactose plus ou lactose moins : Si la souche est capable d'utiliser le lactose comme source de carbone, il y a production d'une substance bleue, la colonie sera donc bleue et dans le cas contraire (souche lactose moins), elle sera blanche.
 - Les colonies blanches sont repiquées sur MRSneutre et incubées à 37°C.

Résultats

20 Cela a permis d'obtenir les souches suivantes, possédant un phénotype lactose moins qui ont ensuite fait l'objet de dépôts auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris, France, en accord avec les dispositions du Traité de Budapest :

I-3504 déposée à la CNCM le 14/10/05 ; issue de la souche mère I-3431

I-3505 déposée à la CNCM le 14/10/05 ; issue de la souche mère I-3434

I-3508 déposée à la CNCM le 14/10/05 ; issue de la souche mère I-3435

25 Le phénotype lactose moins des souches obtenues est de nouveau confirmé sur un milieu gélose MRSneutre + Xgal + IPTG (test de coloration dit « blanc/bleu »)

EXEMPLE 2 : Souches possédant un phénotype Lactose moins

La souche **I-3504**, déposée le 14/10/05 auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris, France, en accord avec les dispositions du Traité de Budapest, est une souche de *Lactobacillus helveticus* possédant les propriétés suivantes :

- 5
- Lactose moins ; Fructose moins
 - production de IPP et VPP : voir Figures 4 et 5
 - propriétés d'acidification : voir Figure 1
 - inhibition de l'ACE : voir Figure 6

10 La souche **I-3505** déposée le 14/10/05 auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris, France, en accord avec les dispositions du Traité de Budapest, est une souche de *Lactobacillus helveticus* possédant les propriétés suivantes :

- Lactose moins ; Fructose moins
- production de IPP et VPP : voir Figure 5
- 15 - propriétés d'acidification : voir Figure 2

La souche **I-3508**, déposée le 14/10/05 auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes), 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris, France, en accord avec les dispositions du Traité de Budapest, est une souche de *Lactobacillus helveticus* possédant les propriétés suivantes :

- 20
- Lactose moins ; Fructose moins
 - production de IPP et VPP : voir Figure 5
 - propriétés d'acidification : voir Figure 3

1. Mesure des propriétés d'acidification des différentes souches variantes

25 Les propriétés d'acidification sont évaluées comme suit :

Un milieu contenant 120g de poudre de lait écrémé (PLE) dans 930ml d'eau est pasteurisé 10min à 95°C. Ce milieu estensemencé à 0.5%, puis soumis à fermentation à 37°C en présence de différentes concentrations de glucose. (L'abréviation Gx indique une concentration de x % (p/p) de glucose dans le milieu avant fermentation). Le pH est alors suivi en fonction du temps, pour différentes souches. Un prélèvement de milieu fermenté effectué à 30h de fermentation sera

30

utilisé pour les mesures de production des tripeptides IPP et VPP ainsi que pour les mesures d'activité ACEI dont les résultats seront donnés ci-dessous.

Pour I-3504, on présente aussi les résultats de la souche mère (I-3431, souche lactose plus). (voir figure 1)

5 Pour I-3505, on présente aussi les résultats de la souche mère (I-3434, souche lactose plus). (voir figure 2)

Pour I-3508, on présente aussi les résultats de la souche mère (I-3435, souche lactose plus). (voir figure 3)

10 Les résultats présentés sur les **figures 1-3** montrent que les souches selon l'invention permettent avantageusement de finement contrôler le pH en fin de fermentation selon la quantité de glucose initialement présente dans le milieu. Par ailleurs, la fermentation par des souches lactose moins conduit avantageusement à des valeurs de pH élevées, qui donneront des produits alimentaires organoleptiquement acceptables.

15

2. Mesure de la production des tripeptides IPP et VPP

Matériel et méthode

Un échantillon de milieu laitier prélevé à 30 heures de fermentation, tel que décrit précédemment au point 1 est utilisé pour faire cette mesure.

20 L'analyse du contenu en peptides, notamment la teneur en tripeptides IPP et VPP, est conduite avec une méthode de chromatographie liquide CLHP couplée à un détecteur de type MS/MS comme décrit ci-après :

25 - Du fait des interférences inhérentes à l'analyse d'échantillons complexes, l'usage d'étalons internes deutérés ajoutés en quantité connue et maîtrisée au moment de la préparation de l'échantillon est fortement conseillée.

30 - La préparation de l'échantillon se fait par dilution du milieu fermenté dans un mélange d'eau, de méthanol et d'acide trifluoroacétique (50/50/0.1%), contenant 25 ppm d'étalon interne VPP deutéré (noté par la suite VPPd, de formule H-Val [D8]-Pro-Pro-OH, MM = 319,45 g/mol, disponible auprès de la société Bachem Chemicals, France) et 10 ppm d'étalon interne IPP deutéré (noté par la suite IPPd, de formule H-Ile [D10 N15]-Pro-Pro-OH, MM = 336,2 g/mol, disponible auprès de

la société NEOMPS, Groupe SNPE, 7 rue de Boulogne, 67100 Strasbourg, France) dans un rapport de 1 à 3 (par exemple, pesée précise dans un eppendorf de 600 mg d'échantillon dans 1200 mg de mélange eau-méthanol-TFA contenant les étalons internes).

5 - Cet échantillon dilué est ensuite centrifugé à 14000 g pendant 15 minutes. Le surnageant clair obtenu, contenant les peptides générés pendant la fermentation, est ensuite dilué précisément au 1/50ème dans un mélange d'eau-méthanol (50/50, v/v) contenant 0,1% d'acide trifluoroacétique.

10 - La solution diluée ainsi obtenue est ensuite analysée dans un système chromatographique CLHP de type Agilent 1100 (société Agilent Technologies France, 1 rue Galvani 91745 Massy cedex, France), équipé d'une colonne adaptée à l'analyse des peptides, de type Waters Biosuite® (3 mm 2.1 x 150 mm, C18 PA-A, WAT186002427, Waters France, 5, Rue Jacques Monod, 78280 Guyancourt) à la température de 50°C, débit de 0.25 ml/min. Les peptides sont élués de façon
15 classique avec un gradient croissant de solvant B (Acétonitrile + 0.100% d'acide formique) dans le solvant A (Eau + 0.106% acide formique), sur une durée de 35 min à 2 heures en fonction de la résolution chromatographique souhaitée. La méthode adaptée au dosage des peptides IPP et VPP utilise le gradient suivant :

Temps	% Tampon A	% Tampon B
0	100	0
3	96	4
6	89	11
15	60	40
18	0	100
21	100	0
24	0	100
27,5	100	0
35	100	0

20 - La détection se fait à l'aide d'un détecteur spécifique de type MS/MS, par exemple avec un appareil à trappe ionique comme l'Esquire3000+ (Bruker Daltonique, rue de l'Industrie, 67166 Wissembourg Cedex), paramétré en ionisation electrospray en mode positif, soit pour l'analyse globale du contenu peptidique (mode MS-MS), soit pour la quantification précise et spécifique d'un peptide à partir de ses fragments

caractéristiques (mode MRM). Dans le cas du dosage des peptides IPP et VPP, mais aussi des étalons internes IPPd et VPPd, ces peptides sont isolés à partir de leur masse spécifique (ions monochargés 312,2 Da pour VPP ; 326,2 Da pour IPP ; 320,2 Da pour VPPd ; 337,3 Da pour IPPd) et quantifiés à partir de l'intensité de leurs ions spécifiques après fragmentation (fragments \geq 85 Da).

L'intégration des pics chromatographiques de chacun des peptides IPP, VPP et la comparaison aux surfaces de pic des étalons internes de concentrations connues IPPd et VPPd permet ensuite de calculer, par régression linéaire simple, la teneur initiale de l'échantillon en VPP et IPP (généralement exprimée en mg/kg ou ppm).

10 Résultats

	VPPEq (mg/kg de milieu fermenté)
Calpis CM4	51
CNRZ 244	57
I-3504 (avec 2% (p/p) de glucose)	80

La **figure 4** montre une comparaison de la production en tripeptides IPP et VPP de la souche **I-3504** (2% (p/p) de glucose sont ajoutés au milieu) par rapport à deux souches de l'art antérieur.

15 La souche CM4 de la société CALPIS est décrite dans le brevet EP 1 016 709 tandis que la souche CRNZ 244 est décrite dans la demande de brevet WO 2004/060073. Il est clair sur cette figure que la souche **I-3504** (souche selon l'invention) a une production de tripeptides IPP et VPP bien supérieure à ces deux précédentes souches dans les mêmes conditions.

20 La **figure 5** montre une comparaison de la production en tripeptides IPP et VPP des souches selon l'invention entre elles.

3. Mesure de l'activité ACEI (Inhibition de l'Enzyme de Conversion de l'Angiotensine)

25 Matériel et méthode

Un échantillon de milieu laitier prélevé à 30 heures de fermentation, tel que décrit précédemment au point 1 est utilisé pour faire cette mesure. La présente méthode a

pour base la méthode de Cushman et Cheng (Cushman et al. Biochem. Pharmacol. 1971. 20 :1637), adaptée pour la rendre compatible avec des échantillons de type produits laitiers fermentés.

1. Préparation des réactifs et solutions

5 1.1 Tampon borate de sodium 0.1M pH8.3, additionné de 0.3M de NaCl

Peser 6.1843g d' H_3BO_3 (Carlo Erba ref :402 766). Dissoudre dans environ 800 ml d'eau déminéralisée, ajuster à pH 8,3 avec une solution de NaOH puis ajouter 12,0 g de NaCl (concentration finale 0,3 M) et compléter à 1 litre avec l'eau déminéralisée.

10 1.2 Préparation du substrat HHL : solution de Hip-His-Leu à 5mM dans tampon borate de sodium 0.1M pH8.3 avec 0.3M de NaCl

Peser exactement 42.95 mg de peptide HHL anhydre (N-Hippuryl-Histidyl-Leucine tetrahydrate PM :501.5g, Sigma-Aldrich ref :53285-250 mg) et dissoudre dans environ 15 mL de tampon borate de sodium 0.1M pH8.3 avec 0.3M de NaCl puis compléter à 20mL avec ce même tampon.

15 1.3 Préparation de la solution d'ACE à 0.1U/mL

L'enzyme de conversion de l'angiotensine sous forme de poudre lyophilisée (origine : poumons de lapin, Sigma-Aldrich ref A6778, 0.25 unités) est solubilisée dans 2.5mL de tampon borate de sodium 0,1M pH 8,3 pour obtenir une solution à 0,1 U/mL. La solution ainsi préparée doit être utilisée, stockée à 4°C, au maximum
20 2 semaines pour préserver une activité enzymatique suffisante.

2. Préparation des échantillons de lait fermenté

Il est nécessaire de conditionner l'échantillon à un pH compris entre 8.0 et 8.5 de façon à être proche du pH optimal de l'ACE. Le lait fermenté est tout d'abord centrifugé, le pH du surnageant est ensuite ajusté entre 8.0 et 8.5 (idéalement pH
25 8.3) puis ultrafiltré à l'aide d'unité de filtration Vivaspin avec un seuil de coupure de 10 000 Daltons (Vivascience, France) afin d'éliminer les éléments interférents (protéines entières, sels de calcium).

Le protocole complet est le suivant :

- Déposer environ 6mL de lait fermenté dans un tube falcon 15mL après avoir préalablement pesé le tube vide. Peser la quantité de lait fermenté déposée dans le tube.
- Centrifuger à 14 000g pendant 10min à 10°C.
- 5 - Récupérer le surnageant
- Quantifier la proportion culot/surnageant ce qui permet si nécessaire de déterminer l'IC50 équivalente au produit d'origine et non à son seul surnageant.
- Prélever 2.0mL de surnageant dans un tube à essais et mesurer le pH.
- Ajouter le volume nécessaire de NaOH 2M afin d'obtenir un pH compris entre 8.0 et 8.5 (cible : 8.3) après ajout du tampon borate, puis agiter
- 10 - Ajouter le volume nécessaire de tampon borate pour diluer le surnageant de départ au ½ en tenant compte du volume exact de NaOH ajouté (par exemple : prise d'essai de surnageant = 2mL + 250µL NaOH + 1.75mL tampon borate)
- Vérifier que le pH final est compris entre 8.0 et 8.5. Au-delà, recommencer en ajoutant plus ou moins de NaOH. Un précipité se forme : il est dû aux sels de calcium.
- 15 - Ultracentrifuger l'échantillon à 12 000 g pendant 15 min à 10°C à l'aide d'unités de filtration Vivaspin 10 000 Daltons (capacité 4-6mL) afin d'obtenir un échantillon limpide.

20 3. Mesure de l'inhibition de l'ACE par les échantillons de laits fermentés

Lors de chaque série analyse, des témoins contrôles (0 et 100% activité ACE) doivent être préparés. Pour chaque échantillon, deux essais indépendants et un blanc échantillon sont réalisés pour chaque dilution. Il faut en effet ajuster au plus près (en diluant) la quantité d'échantillon nécessaire pour diminuer de 50% l'activité de l'ACE.

25

Pour cela :

- Déposer 80µL de l'échantillon conditionné à pH8.3 dans le tube blanc et dans les tubes essais
- Déposer 80µL d'eau déminéralisée dans les tubes contrôle 0 et 100%
- 30 - Ajouter 200µl de la solution de substrat HHL à 5mM dans tous les tubes. Agiter.

- Placer les tubes dans un bain d'eau thermostaté à 37°C, laisser s'équilibrer en température
- Déclencher la réaction enzymatique par ajout dans chaque tube de 20µL de la solution d'ACE à 0.1U/mL, sauf pour les blanc échantillons et contrôle 0% pour lesquels il faut déposer 20µL de tampon borate pH 8.3.
- Laisser hydrolyser pendant 1h exactement à 37°C.
- Arrêter la réaction en ajoutant dans chaque tube 250µL de la solution d'HCl 1M.

Tableau récapitulatif de la composition des différents milieux réactionnels :

	Prise d'essai	Ajout du Substrat	Déclenchement hydrolyse
100% contrôle	80µL eau déminéralisée	200µL HHL	20µL ACE
0% contrôle	80µL eau déminéralisée	200µL HHL	20µL tampon borate
Echantillon (essai)	80µL échantillon	200µL HHL	20µL ACE
Blanc échantillon	80µL échantillon	200µL HHL	20µL tampon borate

La lecture se fait par extraction du substrat hydrolysé (acide hippurique) et sa quantification à l'aide d'un spectrophotomètre, avec le protocole suivant :

Ajouter dans chaque tube 1.7mL acétate d'éthyle, agiter.

Centrifuger à 2000g pendant 5 min à 10°C

Prélever 1mL exactement du surnageant dans un micro-tube eppendorf

Evaporer l'acétate d'éthyle à 120°C pendant 10min dans un bloc chauffant

Ajouter exactement 1mL d'eau déminéralisée puis agiter 10 sec pour reprendre l'acide hippurique.

Lire l'absorbance à 228 nm dans des cuves adaptées à la lecture dans l'UV

Expression des résultats :

Le pourcentage d'inhibition de l'ACE est calculé comme suit :

$$\frac{(\text{Abs } 100\% \text{ ctl} - \text{Abs } 0\% \text{ ctl}) - (\text{Abs éch} - \text{Abs blanc éch})}{(\text{Abs } 100\% \text{ ctl} - \text{Abs } 0\% \text{ ctl})} \times 100$$

Avec Abs = absorbance à 228 nm après extraction de l'acide hippurique

ctl = contrôle

éch = échantillon

Pour un lait fermenté, nous exprimons l'IC50 comme étant la quantité de surnageant de ce lait fermenté qui inhibe 50% de l'activité enzymatique de l'ACE dans le milieu réactionnel, soit en microlitres de surnageant de lait fermenté par millilitre de milieu réactionnel.

Résultats

La **figure 6** montre une comparaison de l'activité inhibitrice de l'enzyme de conversion de l'angiotensine des différentes souches selon la présente invention comparées à d'autres souches de l'art antérieur.

En ordonnée est exprimée la concentration équivalente de lait fermenté par ml de milieu réactionnel nécessaire pour inhiber 50% de l'activité de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (IC50). Plus cette concentration est élevée, moins la souche a donc de capacité à inhiber l'enzyme de conversion de l'angiotensine.

EXEMPLE 3 : préparation d'un produit laitier (probiotique) selon l'invention

Un produit laitier fermenté est obtenu comme indiqué ci-dessous.

Du lait de grand mélange, préalablement écrémé, pré-pasteurisé et refroidi à 4°C est standardisé en protéines (4.0%) avec de la poudre de lait écrémé et additionné de glucose à raison de 1.8% (p/p). Le milieu laitier ainsi préparé est soumis à une pasteurisation (95°C-8 min). Après refroidissement à 37°C le milieu laitier estensemencé avec une souche selon la présente invention à raison de 10⁷ UFC/mL et maintenu à 37°C pendant toute la durée de la fermentation. Lorsque le pH 3.8 est atteint, le caillé est soutiré de la cuve de fermentation pour subir un lissage (par passage au travers d'un filtre) et refroidi jusqu'à 10°C dans un échangeur à plaque. Le caillé lissé et refroidi est ensuite additionné d'une préparation de fruits (ayant un pH entre 4 et 4,1) à raison de 15% du produit fini, conditionné en flacons de 110 mL et stocké à 4°C pendant 28 jours.

Le produit ainsi préparé contient des tripeptides de séquence IPP/ VPP à raison de 65 mg/kg d'équivalent VPP. La teneur en peptides du produit est avantageusement stable durant toute la durée de vie du produit. La diminution de pH au cours du stockage réfrigéré est avantageusement négligeable (inférieure à 0,1 unité) et la

population des souches selon la présente invention, reste avantageusement comprise entre 10^7 et 10^8 UFC/mL.

EXEMPLE 4 : Identification de mutations ponctuelles non sens dans l'opéron lactose de souches selon l'invention

A partir des séquences des opérons lactose des souches DPC4571 et ATCC15009 disponibles sous genbank, des oligonucléotides (amorces) ont été choisis dans des gènes qui semblaient les plus conservés. Ces oligonucléotides ont permis de réaliser une PCR « long range », puis de commencer le séquençage de l'opéron lactose de souches selon l'invention. Le séquençage était ensuite pratiqué pas à pas, c'est à dire qu'en fonction des séquences obtenues, d'autres amorces ont servi à de nouvelles réactions de séquence.

Une mutation non-sens a été identifiée dans la souche I-3504 par rapport à la souche mère I-3431 : dans le sens 5'–3', une base Cytosine est remplacée par une Thymine, ce qui fait apparaître un codon stop à 1320 paires de bases du codon initiation du gène *lacL* (qui fait environ 1900 pbs) codant pour la β galactosidase.

A part cette mutation, les opérons lactose des deux souches I-3431 et I-3504 sont identiques.

Séquence de l'opéron lactose de la souche I-3431 (mutation encadrée)

20 aatgaaaattcatgatctaactctggattaatgtgataagcgcttcaacatcagtgcccagctgtcaattcctccaacgccgca
 aactgcacctgcaactactaacacggctctgcaacaagtggtagttctcaatgtagtagcgttctcaagctcctcagcagata
 aggcaacaactgaaattaaatggttttctgctgtggaatgagagactgaaactttcattgtacgatctacattatgtgtggttc
 acgattaatggtaacttcttagttgcatgtgcattcatttctgcggaaccaaataactcggtaactggcaaccatcgatagga
 attaccttcttagctccagccattctatcaggataagttcaccggataaaccttcataatcaaactcctgtagcagccggtggcata
 25 atcaatcgaataccaattacaggcaggggtggaatcccttctaccataataacgcattgtaacctaattgtgaccgacatcatc
 aatattatagatgattttgcatgtgaggagtagttaaagttgataggtaaatgaaattcagcacttttgcatactcgtgattgct
 aaattgtgttaaagggtgcaataggcagttcggcaaaagtcattgtctgtctacttttaaaggatatacagtaacatttagtaacatat
 cagctccgagccattgagctgccttagattaaatccactgcctcggctggtatctgtagttgctcgcaaaaagtaggagtaggta
 cagataaaagccattcctgccgtgacttttaacgattcaagtcgcccgcgttcataactaaagatgattgaaaactttgccaata
 30 acgcaaatgtggcatcccataaatgatagcaattgattttgtgtaatacataatagtatctcacttctgcatagctggtttggg
 tttctatctgcaaacattaaaccatcgccagaaaattcataatctgaatgacgatcatcaaaattgccgcataacgcaaaacat
 catgtccactaattcatcatgaaccaataatgcctgatcgataaagtcccagataaatccaccgaagtattgagggatttatcaa
 gtaattgatataatccatgccgcccgttagaattgccatgtcatgataatcgcattccataaatggccttgggtggatcatttg
 caagtattctcaaccttttaggtggtaaatacatacagcttcaacatctgaaatttatctttaattcgggacgggtgactacgcctt
 35 cataggaactaagcgtgatcatcgtgagattgtaaaattcattcattgcatgatgtgtctccagcataggattcgttgccaagt
 gacaaaagagaatagaggtgtgattctgaaagctcgtagttattgctgctgatcaatcactgcttcttcattgcggaatcg
 aactggtacattgtcagaaggtcaatctctccatttttgccaagtacatgtgattcaagggtattctcgccatgacataaatg
 ccatttgatcgcaagataataccacggaattgggtggtagtgacatgttcaacagcattaatattttctttaaagattaa
 40 tgcagttgcatatcactcattgtatgctgacaccagtttgcattcattcattgataaataaacgcttgcca
 ttaacaaaacaacttttctggactaattcaattctcctaaagccaaattggaaaggaatcagctctagcaagtttggttcatca

taaactcaattagaagctgataaagatatggatcatggttattccaaagatgcacgtttcgaattttcattattaattgaacgttctc
tttgatacttcattttctccagaagagatgtcccttaatatctttgactaataaatggaatgaaccggatttttaccaataaaatgaa
gcttaaggtgaagatgccatcttgataattatctgcaactcgtggttcaaatccatgtccattaagtgggtagcggggatacctag
tagttcaactgagcgggaagatgccagagaagcgggaacatgtcttggcttctagccaagatgcagctactgttttaaaaacttcta
5 ctgctaaaagattatcttttctgaatataatggcgttaaatcaaatctgaaggagtaaagctgtctccgcatagcccacaaaatg
cccgtaaccatacatacattgcttttcgacgccttcaaatgaacatctttccaattaaggctgagcttaaatcaaatcg
ctcaagatgaaccgactgtgttatctgcgcctttgctaaatgagccttctcatgatcattaggatctaaagcgttaagctggcg
cggaagatttgcctcccaaggaaggagacattaatataattgatttgagtatagttgctcaattcgattcacttggaaactgggat
cgaatcaaaaattgaagaatcaaatcacgctgataaaaatctgtggacgatccataggattagcggaaaaatgaaattccat
10 ttccatttaactttgtgatagctactgtgttgcctttgacctcgcgataatctctaaaaagggatgatcactgtgtcgggcaatt
gattgacctgaatacctcaggattatctagccaattgatattgcttgcataatgacctcatttctataaaatataattcgaagc
gctttattatagcatgataaataacaattattagtagtaagaattattacaatatttaataagattacttgcataaagactg
aatacatgcagataatagaacctttatttggaaattagtaaatatttataataaagaaagagaattataaaaatagaaaag
aaataattatgagaacaattaaagaaattgcgctggaatcaggctattctccagcgcagatcacgtttattaataatgatccia
15 attgtctattactgcagataccaaaaataagattttggagattgctaataaattgggctattgggaagatcatcaagaaaagaaa
atcaagcccacaattgctttactttatcgagtaaatcataaggaacaattgcaggatgagatttcacttcgttgaacaagcatta
gtttcaactgtagagcggagatgcgctgaagatgaaaaactttatgacatagaagatttaatacaagaacgcttctttgtccaagga
tttattggagtagggcgaggccaattgaaaacgcccagttggtaagctgcataaagtttgcctaattggtgtttgtgatccaa
20 tccagctcccgaattattgattcaattcgccctaattgcctctacggtaaaaaatgctattgattgtttatcaaaaatggcattaac
aagatcggtttatcggtagcgttggcctaagcatgaccatattcaggaaaaagattgcgttcaattactttgtgaatacatgaa
aactagaggcatggatactaaatggacatgcgttgaaggaccggtagcgttgaatggtataaattgggaaaaatggtttg
gctaaatacaaaaatgattacctgaagcatttttaattgcatctgatactttagccgttggcgtttacaagccttaacgaagaaa
cgtaaatgtacaaaagataactaagatcttaagtataaataagcaatgtggttaagatgtttaccaccactttctcgttcaaca
25 ttaatcaacaagaaatgattgatagcacttgatactttgactcatttgattatccagatcgaccaagattgatccggatg
aacactaattgtagtacgaaaaagcttcgttcccaagaaaagtaaattttagtaaaaaatattttgatagaaaataaaa
aagagaatgtgaacagctcacattcttttatttacttagtaacaaggagcgtatatagactttcatgcaaacgattgcagagatt
cattggggaggaaggaaaaagatgaataatcaaaaatctcaggaaagcaagtcattcctatgcgctctttgtttggggaatt
aggatacgcagcttttatggcgtaatgagtagctatttattttatcactagtgccatgtttacaggactagatcattcagttgcag
30 ataagtaattggcttaattactgcattgatagtttagtaagaaattgtagagttagtaattgatccagtggtgggaacatcgttga
aatactaaaacaaggtaggcaagtttaagccttggatctttattggaacggtagctagtgccgacttactgctaattctcttactg
gtattttcggctggcacataagagttgattcttttgaatatttgaatcatttatatcggtttgacgtttttatccttatcagatgg
ggcatggttccagccttaagtgaggattcacacgcacgttgatttatactgctttggggacttttcaggtgcaattggttgaacg
gactaactatcattgttgcactgggtaccgggtgaacttatgcaatgactggcaagcatgaagaaggggctcctggttggttg
cctttgcggcggttattcagccttagctattctttgtgactaatcgtatgtttaggaactaatgaaaaacataatttaattagaaattct
35 gccaagtaaaaacaactttaggtaagattttggggcaatttcacataatgatcagatttatagccaagtttgcttattgatgttc
tcattggctaattgaattacaaaagggtaattgtttatctgtacaaatcgtgattaataaaccacaaatgacttctgggttgttgggtca
ttgccacattaatcgttttgcattagctcattgtttccaatttaataaataatattccaagaaaatggctatttattggcggcacaattg
tatgattttggcatacgggttgttcaatttcggcgcataaacgctatttaattggaatttagggttagctctatttaatacaactttgctcaa
ttagtaactgttttaacattaactgatgccatcgaatattggtcagctgaaaagtggtcagagaaatgaagccgctgttttagctgttc
40 gaccaatggtcgataaattaccgggtgctatttcaaacgcgctagtaggatattgtagcaattgcggcaggcatgactgggtcagc
aactgcagcagatagacaagtcacgatattagcatttcaatattatggctttatgtgccattaattttggcagtttagctattatcat
ttttataagcaaggaactttatctgaaaagaaacacgctcaagtggtgaagaattaaagagcaaacctgcacaaggaagat
cgaagatggcaatttaccgtagcaaatttaaagtcgactgccattatgcacctgcagatggtaaatatgactatgtctgaagt
aatcgatgaaaatggcaaacatttctggttaaggcttgaatcgaatccaagcagtgggcaaattttggcacattgatggtta
45 aaattaagttacctttggtaccaagcatgcgtttgaaattgtaactgaaaatggtctgcaagttatagttcacgttggcttggcaca
gttaattgcgtggtgaaggattgagtcattatgatgatggacaaattgttaaaaaaggtgaactgctattagaatctgaccgtg
atttagcactaaaaaatggtataaagatacगतatgaattttctatactcaacctggttagagtagaaaaaatgagtaaaattcgg
caggtaagttgttgaacatggtcaaaagggtggtgaagtgaagtttaagtagaggaaactgatgtaagcataaatttaattga
50 ttacatgtataaaaaagaatgacttttagtgaagtaaaacttttggtaagaaaaaatttataagccttttttaaaaaagaatg
acgtaataagcctttcttaaatatttatacttagtaaatagcttagtaaatctaaataaataattttactagaacaaaaaaaatgat
aaattattcgtgtaagcattctgaaaaggaaatctgggaggaattatcatgcataatcataaagtttcggggaacaaaatagttt
cctatgcattatttctgggcaatttggggcactcagcattttatggtgtaatgagtacatattttatttttactagtggaatggtt
agcggattaaatcaatccgttgcgtgataaattagtaggttaattactggattaatggtactagtaagaattatcgaactagtcattga
ccctattttgcagcattattctatttactggatttttggattagcacacagaattggatcctttttgcaattttgttggttgattt
55 acatcgttttgatgtttctattcattatcagatgtttcatattggggcatggtccagctttgagtgaagattcacatgaacgtggtatt
atacttacttgggtgctttcaggtagctattggttgaatagtttggcaattattgttggcactgggtaccgggtgaacttacgcggtt

actggcaaacacgaagaaggagcicctggctgggtcgcccttgccggccgtaatttcagccttagcaattattgtgccttgattgttg
 ctttggtactaaagaaaagcacaacattattagaaattcggccaaacagaaaaccactttgctcaagattttggtgcgatttcc
 ataatgatcaaattttggtccaagtttagcttacttattgtattcacttgctgttgaattactaatgggtgtttgtctacatgtacaagtt
 gtaattggcaagccaaatgatttctgggtagtaggtgaattgcaacaattattggtgctgcattagtccatcttcccggtttgaac
 5 aaatattccaagaaaatggtgtttattgcaggccaaactgtatggtattagcatatgcctatttatcttggctgtaacaatgtctt
 ctaatggattaggcttagtttattcaatattaacttcgctctgttggaactgtttaactttaactgatgctattgaataggcaactta
 agattggtcaaagaaatgaagccgtgttttagctgtcgtccaatgattgataaattactggtgctgttcaaagccttagttggta
 tgtggcaattgcagctgggatgactggatcagctactgcagcagatgacgagcaaaggattataacacatttaattatggctt
 atattccttagcttggcagttttatctattgtatgtttgagcaaagtaactttgagtgaaaagaaacacgcacaagttattgaa
 10 gaattgaagagtaaactgcacaaggcagattgaaaagaagacttcagtagatacaggaacaaaagaagtaactattatg
 cacctgctgatggtgaattaatgcaaatgtcttctgttggatgaagatggtaaaccattccctggtaaaggattgcaattgagcc
 aagcagtggtcaaattatgcaccattgatggaacgatcaagttacttccgtacaagcatgcattcgagattgtgtcaca
 tggactacaagttgttccatgtaggattgggtactgtcaattacgtggagaaggcttgaaacttctacgatgatggtcaaaca
 15 gtgaaaaggcgcgataaacttgagttgatcgtgattggcttaacaatggtataaagacacgatcgtgatattctatactc
 aaccaggtagaattcaaaattctggtgctattcaagctggtaaagatat

De même, des analyses de séquençages révèlent les mutations suivantes dans l'opéron lactose de souches selon l'invention :

- Souche I-3505 par comparaison à la souche I-3434 :

20 Dans la souche I-3505, une base adénosine remplace une base guanine qui provoque l'apparition d'un codon stop, à 1713 paires de bases du début du gène *lacL* codant pour la bêtagalactosidase.

- Souche I-3508 par comparaison à la souche I-3435 :

25 Dans la souche I-3508, une base adénosine remplace une base guanine qui provoque l'apparition d'un codon stop, à 183 paires de bases du début du gène *lacL* codant pour la bêtagalactosidase.

* * *

Revendications

1. Souche de *Lactobacillus helveticus* n'ayant pas la capacité à transformer le lactose en acide lactique,
5 et capable, par fermentation à une température entre 30 et 45°C, plus préférentiellement entre 32 et 43°C et encore plus préférentiellement à 37°C d'un milieu laitier contenant une quantité de glucose supérieure à 3% (p/p) et avec une teneur totale en protéines supérieure ou égale à 2% (p/p), préférentiellement entre 2 et 10% (p/p), plus préférentiellement entre 2,5 et
10 6% et encore plus préférentiellement égale à 4%, de produire les tripeptides de séquence IPP et/ou VPP en une quantité d'au moins 25 mg, préférentiellement au moins 50 mg, plus préférentiellement au moins 75 mg de VPPEq par kg de produit fermenté.
- 15 2. Souche de *Lactobacillus helveticus* selon la revendication 1, possédant au moins une mutation dans l'opéron lactose.
3. Souche de *Lactobacillus helveticus* selon la revendication 2, possédant au moins une mutation ponctuelle introduisant un codon stop dans l'opéron
20 lactose.
4. Souche de *Lactobacillus helveticus* selon l'une quelconque des revendications 1-3, telle qu'un milieu laitier à 4,0% de protéines totales contenant 1,0 % (p/p) de glucose fermenté par ladite souche de *Lactobacillus*
25 *helveticus* pendant un temps maximal de fermentation de 30h, à une température entre 30 et 45°C, possède un pH supérieur ou égal à 4,0, préférentiellement supérieur ou égal à 4,1.
5. Souche de *Lactobacillus helveticus* selon l'une quelconque des revendications 1-4, qui possède en outre un phénotype fructose moins.
30

6. Souche de *Lactobacillus helveticus* selon la revendication 1, choisie parmi:
I-3504 déposée à la CNCM le 14/10/05 ;
I-3505 déposée à la CNCM le 14/10/05 ;
I-3508 déposée à la CNCM le 14/10/05 ;
et les souches variantes ou mutantes dérivées de celles-ci.
7. Utilisation d'une souche de *Lactobacillus helveticus* selon l'une quelconque
des revendications 1-6, pour la préparation d'un produit alimentaire ou
pharmaceutique, notamment d'un produit laitier fermenté.
8. Utilisation selon la revendication 7, telle que ledit produit alimentaire ou
pharmaceutique a des propriétés anti-hypertensives.
9. Produit alimentaire, notamment produit laitier fermenté, comprenant au
moins une souche de *Lactobacillus helveticus* selon l'une des revendications
1-6.
10. Produit alimentaire selon la revendication 9, contenant au moins 10^6 ,
préférentiellement au moins 10^7 , préférentiellement au moins 10^8 UFC/mL
de bactéries *Lactobacillus helveticus* vivantes.
11. Produit alimentaire selon l'une quelconque des revendications 9-10,
contenant au moins 25 mg, préférentiellement au moins 50 mg, plus
préférentiellement au moins 75 mg de VPPEq par kg dudit produit
alimentaire.
12. Produit alimentaire selon l'une quelconque des revendications 9-11,
comprenant en outre des préparations de fruit(s), notamment des morceaux
et/ou du jus de fruit(s).

13. Produit alimentaire selon l'une quelconque des revendications 9-12, possédant un pH supérieur ou égal à 3,85, préférentiellement supérieur ou égal à 4,00, plus préférentiellement supérieur ou égal à 4,20.
- 5 14. Produit alimentaire selon l'une quelconque des revendications 9-13, qui possède des propriétés anti-hypertensives.
15. Procédé de préparation d'un produit alimentaire comprenant les étapes suivantes :
- 10 ▪ sélectionner une matière première contenant des protéines de lait, notamment des protéines contenant les séquences peptidiques IPP et/ou VPP;
- 15 ▪ sélectionner au moins une souche *Lactobacillus helveticus* selon l'une des revendications 1-6,
- 15 ▪ ensemercer ladite matière première avec ladite souche,
- 15 ▪ fermenter ladite matière première en présence de 1-3% (p/p) de glucose pendant 12-30 heures à 30-45°C, et en présence de ladite souche.
- 20 16. Procédé selon la revendication 15, dépourvu de toute étape de thermisation après fermentation.
17. Utilisation de streptozotocine pour l'obtention de souches *Lactobacillus helveticus* possédant un phénotype lactose moins.
- 25 18. Procédé d'obtention de souches *Lactobacillus helveticus* possédant un phénotype lactose moins, comprenant les étapes suivantes :
- 30 ▪ fournir au moins une souche de *Lactobacillus helveticus*;
- 30 ▪ mettre en contact ladite au moins une souche avec une quantité efficace de streptozotocine en présence de lactose ;
- 30 ▪ isoler la ou les colonies de phénotype lactose moins.

19. Procédé selon la revendication 18, comprenant une étape de test colorimétrique sur un milieu contenant du Xgal et/ou du Sgal et/ou tout autre composé lié par une liaison β -galactosidique à du galactose et qui devient repérable suite à la rupture de cette liaison par ladite souche de *Lactobacillus helveticus*.

5

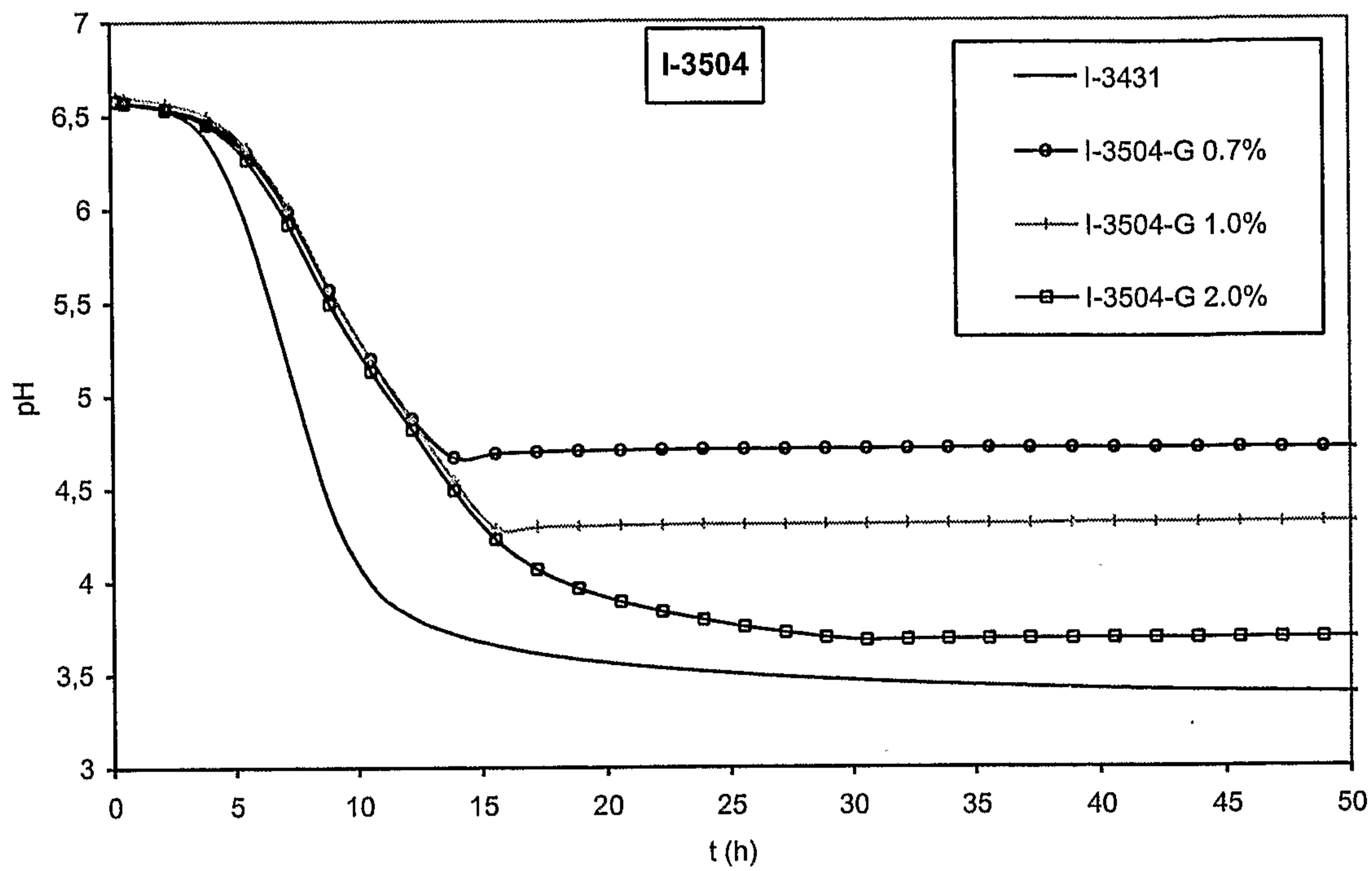


Figure 1

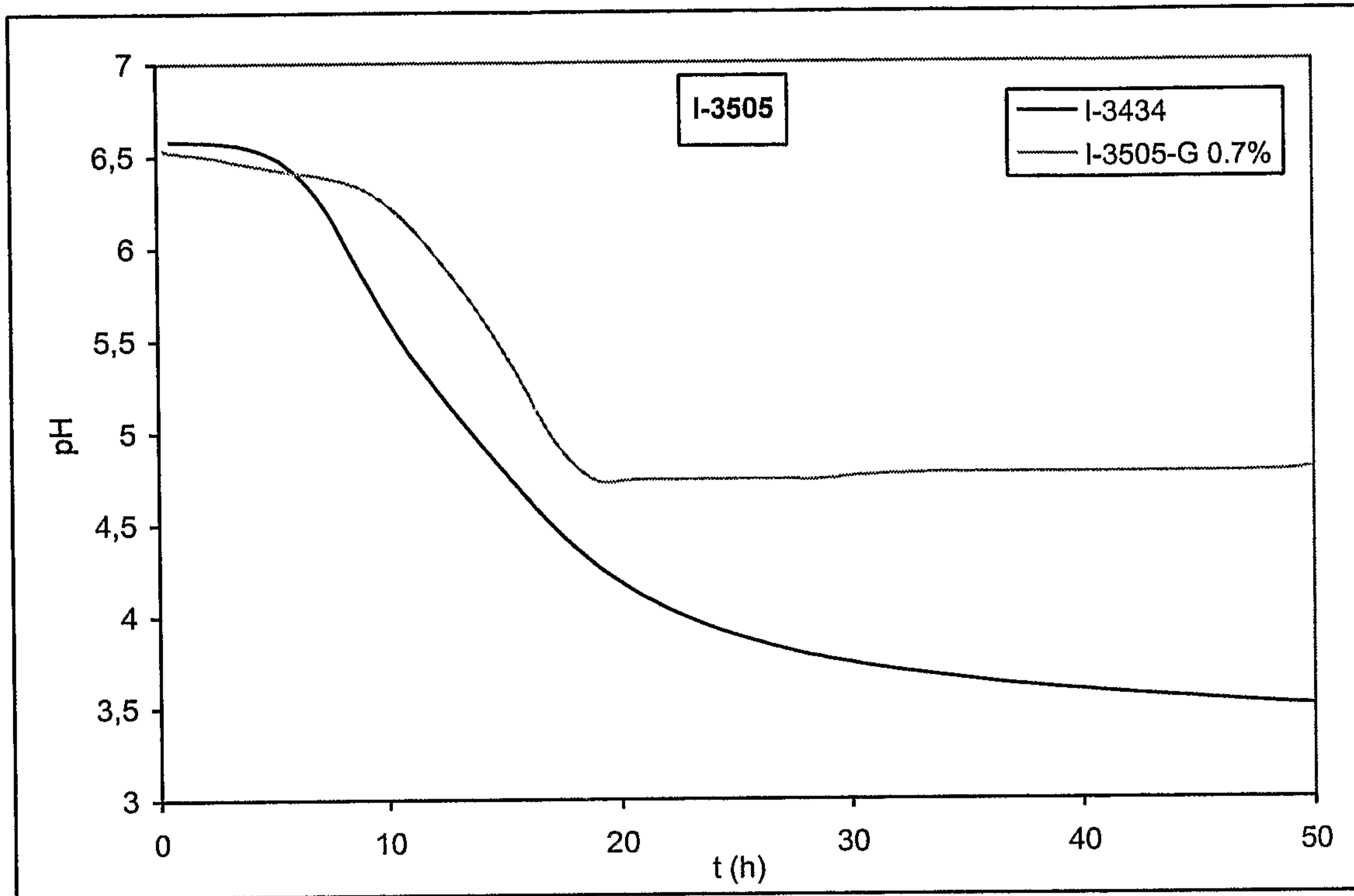


Figure 2

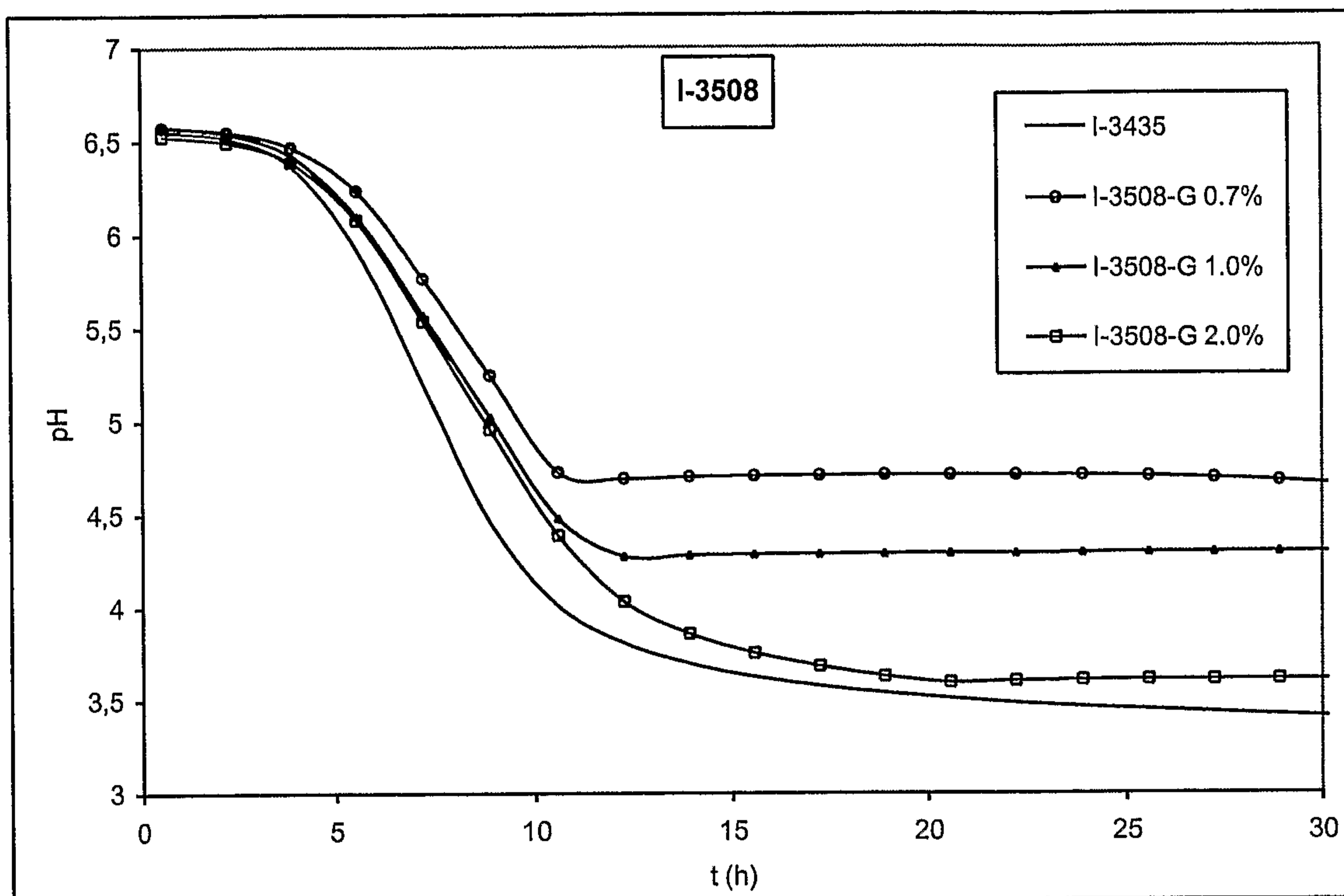


Figure 3

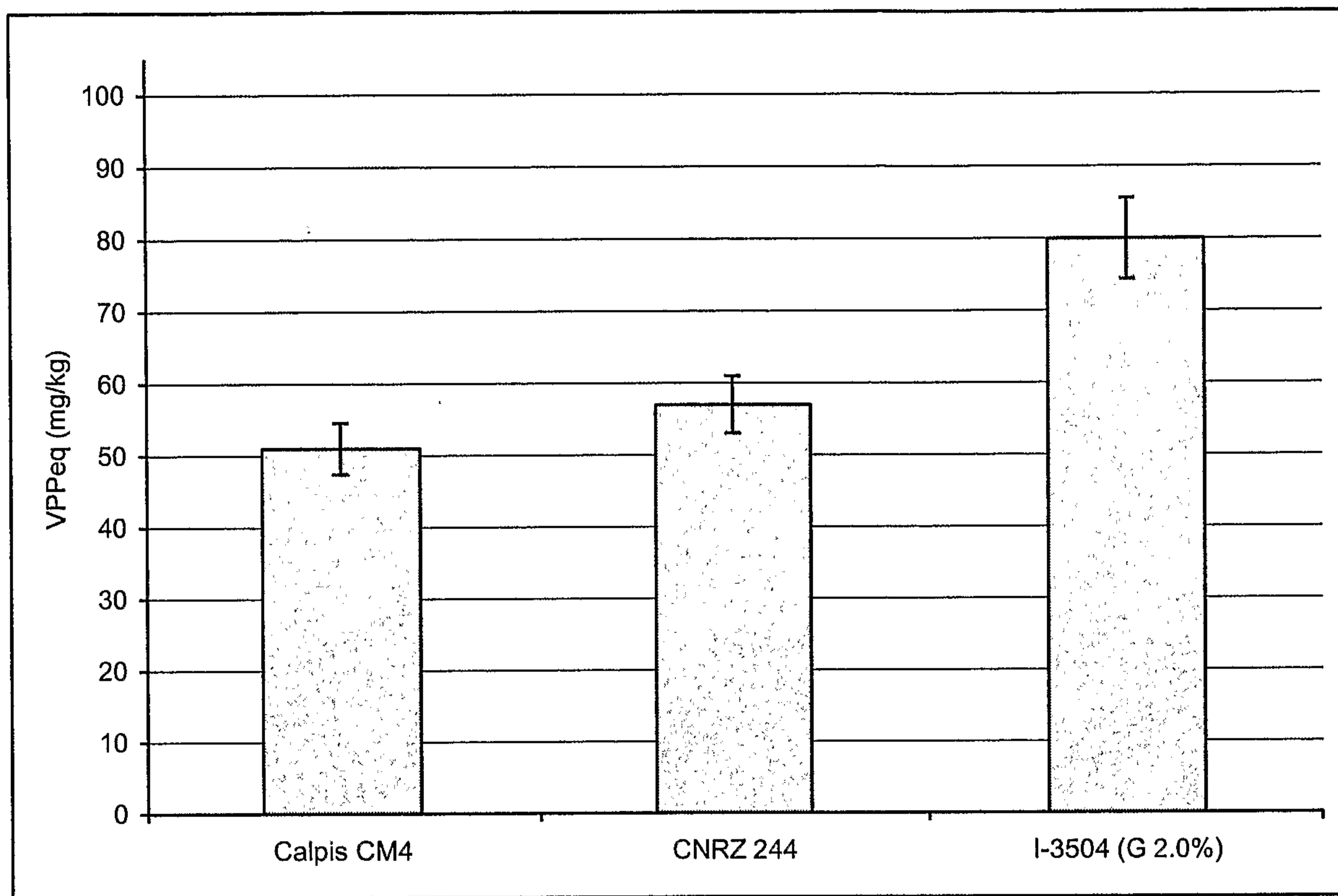


Figure 4

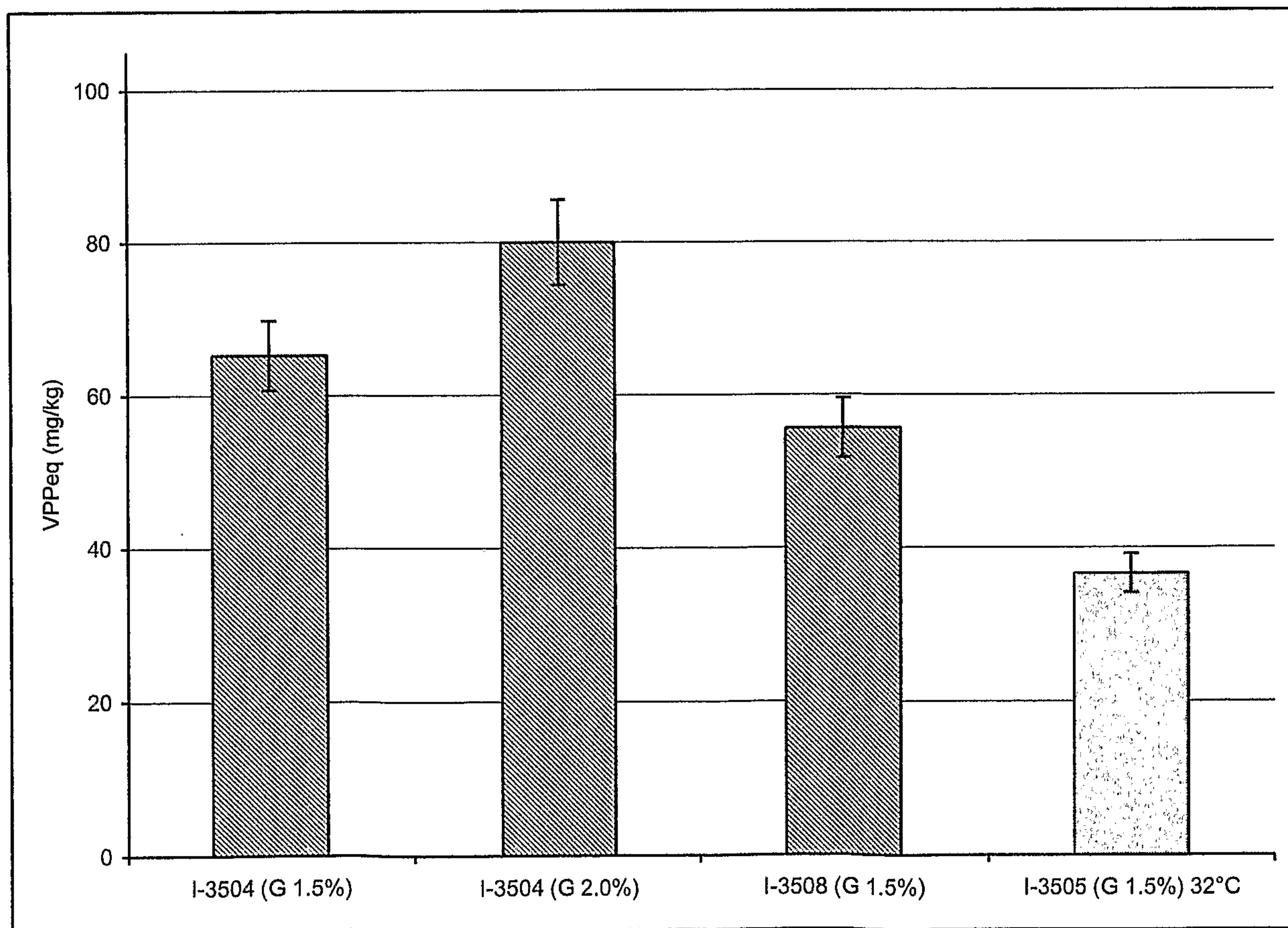


Figure 5

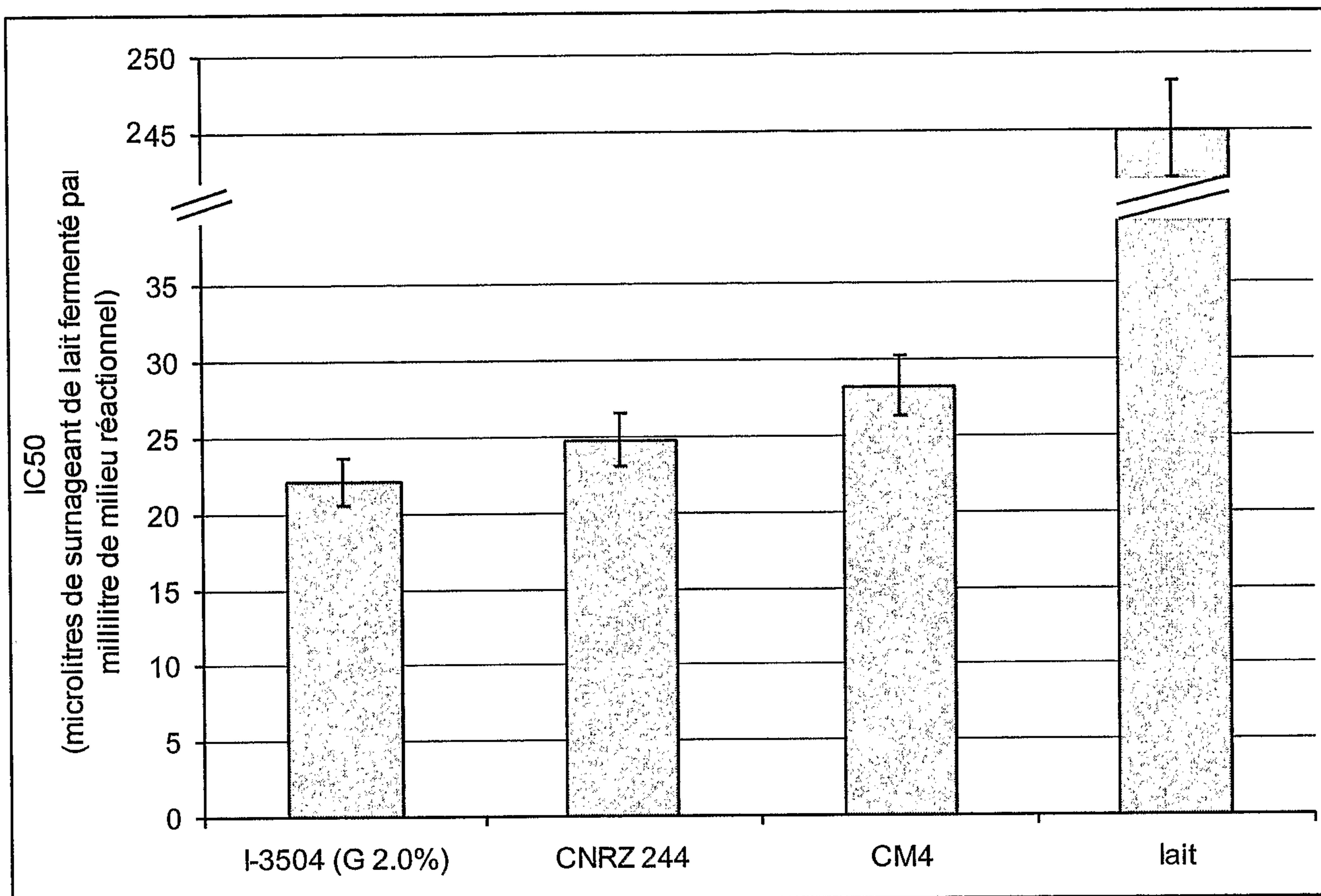


Figure 6