



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2005/10/21
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2006/04/27
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2007/04/19
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: EP 2005/055443
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2006/042862
(30) Priorité/Priority: 2004/10/22 (FR0411275)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C07K 14/315* (2006.01),
C12N 1/20 (2006.01), *C12N 1/21* (2006.01),
C12N 15/01 (2006.01)

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

(72) Inventeurs/Inventors:
GARAUULT, PEGGY, FR;
FAURIE, JEAN-MICHEL, FR;
MENGAUD, JEROME, FR;
DRUESNE, ANNE, FR;
QUERE-CHASSANG, GAELLE, FR

(74) Agent: GOUDREAU GAGE DUBUC

(54) Titre : SOUCHES DE STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS AMI DEFICIENTES A POST-ACIDIFICATION REDUITE
(54) Title: AMI-DEFICIENT STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS STRAINS WITH REDUCED POST-ACIDIFICATION

(57) **Abrégé/Abstract:**

The invention relates to Ami-deficient wild-type strains of *Streptococcus thermophilus* with reduced post-acidification. The invention also relates to the use of said strains for the preparation of fermented food products and to the fermented food products thus prepared.



(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
27 avril 2006 (27.04.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/042862 A1(51) Classification internationale des brevets⁷ :

C07K 14/315, C12N 15/01, 1/20 // 1/21, C12R 1:46

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/EP2005/055443

(22) Date de dépôt international :

21 octobre 2005 (21.10.2005)

(25) Langue de dépôt :

français

(26) Langue de publication :

français

(30) Données relatives à la priorité :

0411275 22 octobre 2004 (22.10.2004) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **COMPAGNIE GERVAIS DANONE** [FR/FR]; 126/130, rue Jules Guesde, F-92300 LEVALLOIS-PERRET (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **GARRAULT, Peggy** [FR/FR]; 37, rue Gabriel Peri, F-91430 IGNY (FR). **FAURIE, Jean-Michel** [FR/FR]; 3, rue Lamartine, F-78350 JOUY EN JOSAS (FR). **MENGAUD, Jérôme** [FR/FR]; 6, rue Dupuytren, F-75006 PARIS (FR). **DRUESNE, Anne** [FR/FR]; 12, allée de la Roseaie, F-91440 BURES SUR YVETTE (FR). **QUERE-CHASSANG, Gaëlle** [FR/FR]; 2, rue de la Madeleine, F-91140 VILLEBON SUR YVETTE (FR).(74) Mandataire : **MARTIN, SCHRIMPF, WARCOIN, AHNER, TEXIER, LE FORESTIER, CALLON DE LAMARCK, COLLIN, TETAZ-CABINET REGIMBEAU**; 20, rue de Chazelles, F-75847 PARIS CEDEX 17 (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, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, 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
— avec revendications modifiées

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: AMI-DEFICIENT *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* STRAINS WITH REDUCED POST-ACIDIFICATION(54) Titre : SOUCHES DE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* AMI DEFICIENTES A POST-ACIDIFICATION REDUITE(57) Abstract: The invention relates to Ami-deficient wild-type strains of *Streptococcus thermophilus* with reduced post-acidification. The invention also relates to the use of said strains for the preparation of fermented food products and to the fermented food products thus prepared.(57) Abrégé : La présente invention concerne des souches naturelles de *Streptococcus thermophilus* AMI déficientes à post-acidification réduite. L'invention vise également l'utilisation de ces souches pour préparer des produits alimentaires fermentés, ainsi que les produits alimentaires fermentés eux-mêmes.

WO 2006/042862 A1

SOUCHES DE *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* AMI DEFICIENTES A POST-ACIDIFICATION REDUITE

La présente invention se rapporte au domaine des bactéries
5 lactiques utiles dans l'industrie agro-alimentaire.

Plus précisément, l'invention concerne des souches naturelles de
Streptococcus thermophilus, ou des variants naturels de telles souches,
lesdites souches ou variants étant AMI déficients à post-acidification
réduite.

10 L'invention vise également l'utilisation de ces souches pour
préparer des produits alimentaires fermentés, ainsi que les produits
alimentaires fermentés eux-mêmes.

Le choix des bactéries lactiques pour la production de produits
alimentaires, notamment laitiers, fermentés fait intervenir différents
15 critères, parmi lesquels l'activité acidifiante et la formation de
composants aromatiques qui sont responsables des propriétés
organoleptiques du produit, ainsi que la production d'agents
épaississants qui jouent un rôle sur la texture et l'onctuosité.

L'activité acidifiante se caractérise essentiellement par trois
20 paramètres : (i) la cinétique d'acidification ; (ii) l'acidité titrable ou le
pH final de fermentation qui conditionne les propriétés
organoleptiques du produit et son aptitude à la conservation ; et (iii)
la post-acidification qui se développe au cours de la conservation du
produit.

25 Une vitesse d'acidification élevée permet de réduire la période
durant laquelle la préparation est sensible aux contaminants, et de
diminuer ainsi le risque de contamination bactérienne.

L'augmentation de la vitesse d'acidification améliore
également l'économie du procédé en augmentant la productivité et
30 la flexibilité du matériel industriel.

Les propriétés de post-acidification des souches sont particulièrement importantes pour la conservation des produits. En effet, les produits frais fermentés sont généralement conservés à des températures comprises entre environ 4°C et 8°C pendant une
5 durée n'excédant pas habituellement 4 semaines. Or, si l'activité métabolique des bactéries est réduite par la conservation au froid, elle n'en est pas pour autant bloquée. Cette activité rémanente entraîne la production d'acide lactique à partir du lactose, ce qui
10 a pour conséquence une diminution du pH et une augmentation de la saveur acide qui dégradent les propriétés organoleptiques du produit.

De plus, outre les critères retenus pour leur contribution à la qualité du produit, d'autres éléments plus spécifiquement liés au procédé interviennent dans le choix des souches, par exemple la
15 température de fermentation, la vitesse d'acidification et la résistance aux phages.

La résistance aux phages est un critère très important dans le choix des souches afin de diminuer le risque d'incidents phagiques en production, lesquels sont susceptibles de bloquer pour décontamination
20 l'ensemble de la production, sur des périodes plus ou moins longues.

Le brevet français FR 2 725 212 décrit une souche de *S. thermophilus*, déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM, Institut Pasteur, Paris, France) sous le n° I-1477, qui présente une cinétique d'acidification rapide permettant
25 d'atteindre un degré d'acidité élevé, et qui ne post-acidifie pas au cours de la conservation des produits laitiers frais fermentés.

Une autre souche de *S. thermophilus* (déposée le 30 décembre 1994 auprès de la CNCM sous le numéro I-1520) est décrite dans le brevet français FR 2 771 600 comme ayant une capacité de post-
30 acidification réduite.

Il n'est toutefois pas avantageux d'utiliser de telles souches pour fabriquer des aliments fonctionnels (i.e., des aliments qui ont un effet bénéfique sur une ou plusieurs fonctions cibles de l'organisme) comprenant notamment des ingrédients alimentaires bioactifs d'intérêt à base de protéines et/ou peptides. Ces souches restent en effet capables de métaboliser (c'est-à-dire de dégrader afin d'utiliser comme sources d'azote) les protéines et/ou peptides, y compris les protéines et/ou peptides fonctionnels d'intérêt, que l'on entend bien évidemment préserver.

10 C'est pourquoi, il est important pour l'industrie agro-alimentaire de disposer de bactéries fermentaires présentant à la fois : (i) une excellente viabilité ; (ii) une activité post-acidifiante très faible ou quasiment nulle ; et (iii) une capacité à métaboliser les protéines et/ou peptides, également très faible ou quasiment nulle.

15 L'industrie agro-alimentaire doit en outre tenir compte d'une quatrième contrainte lorsqu'elle développe des produits, destinés à l'alimentation humaine et/ou animale, dans lesquels sont incorporés des microorganismes, plus particulièrement des microorganismes vivants. Les organismes (ici, microorganismes) génétiquement modifiés (OGM ou
20 mutants) suscitent généralement un sentiment de crainte et d'appréhension chez les consommateurs. Cette image négative dont souffrent les OGM est telle que le public a tendance à « boycotter » les aliments contenant des OGM. Aussi, dans un contexte où les consommateurs exigent toujours plus de transparence quant au contenu
25 des produits alimentaires qui leur sont proposés et quant à l'origine des ingrédients que ces produits contiennent, les industriels préfèrent proposer des produits sans OGM. Il est donc essentiel que les produits alimentaires issus de l'industrie et contenant des microorganismes soient préparés en utilisant exclusivement des souches naturelles ou des
30 variants naturels de souches naturelles.

C'est précisément à l'ensemble des contraintes mentionnées ci-dessus que répond la présente invention, en proposant des souches naturelles de *S. thermophilus*, ou des variants naturels de telles souches, lesdites souches ou variants étant AMI déficients à post-acidification
5 réduite.

La croissance de *S. thermophilus* dans le lait se décompose en trois phases de croissance :

- une première phase de croissance exponentielle, qui ne dépend pas des caséines du lait ;
- 10 - une deuxième phase de croissance dite "de transition" ; et
- une troisième phase de croissance exponentielle, sans doute limitée par le transport des peptides (Letort *et al.*, 2002).

Le système de transport des oligopeptides chez *S. thermophilus* est un transporteur ABC (ATP-Binding Cassette) constitué d'un translocon de
15 quatre protéines (AmiC, AmiD, AmiE et AmiF) et de trois protéines de liaison très homologues entre elles (AmiA1, AmiA2 et AmiA3). La croissance dans le lait de mutants chez lesquels le système de transport des oligopeptides est altéré n'est plus optimale, ce qui montre l'importance de ce système de transport (Garault *et al.*, 2002).

20 Dans le cadre de la présente invention, la Demanderesse a pour la première fois mis en évidence des souches naturelles et des variants naturels de souches de *S. thermophilus*, chez lesquels le système de transport des oligopeptides est au moins partiellement altéré. La Demanderesse a en outre montré que de telles souches et variants ont
25 des propriétés d'acidification du lait particulièrement intéressantes.

D'une part, le pH se stabilise en fin de fermentation pour les variants AMI déficients. En effet, la première phase de croissance en lait n'est pas affectée, et ces variants peuvent conserver une première phase
30 d'acidification relativement rapide tout en ayant une deuxième phase d'acidification beaucoup plus lente. Ils peuvent présenter une courbe d'acidification ayant un fort ralentissement à un pH supérieur à celui pour

lequel l'acidification par une souche sauvage AMI fonctionnelle est ralentie. Ce « plateau d'acidification », à température de fermentation, est intéressant dans la mesure où il permet de stocker plus longtemps à température de fermentation la masse fermentée, et ce, sans acidification trop importante. Ceci confère une souplesse appréciable à la mise en oeuvre des procédés industriels. En effet, les temps de décaillage des cuves de fermentation sont longs compte-tenu de leur volume. L'utilisation de variants AMI déficients permet donc de limiter l'évolution du pH du lait fermenté au cours de l'étape du soutirage (décaillage avec refroidissement ou conditionnement direct).

D'autre part, le seuil de pH pour lequel l'acidification ralentit fortement dépend de la quantité d'acides aminés libres et de di-/tripeptides pouvant être transportés par le système AMI et présents dans le lait. Il est donc possible de piloter le pH d'arrêt de la fermentation en modifiant la teneur (quantitative et/ou qualitative) en peptides du lait.

La présente invention a donc pour objets une souche naturelle de *S. thermophilus* AMI déficiente à post-acidification réduite, et ses variants naturels AMI déficients ayant des caractéristiques d'acidification du lait similaires, ainsi que leurs cultures et fractions de cultures biologiquement pures.

Au sens de la présente invention, on entend par « souche naturelle AMI déficiente » ou « variant naturel AMI déficient », une souche ou un variant dont la croissance est stimulée par un mélange d'acides aminés libres, et non par un mélange constitué uniquement d'oligopeptides.

Par « variants naturels ayant des caractéristiques d'acidification du lait similaires », on entend désigner des souches obtenues sans manipulation génétique, à partir d'une souche naturelle de référence, les souches ainsi obtenues étant, comme la souche de référence, à post-acidification réduite. Dans le présent contexte, on utilisera les termes « variant » ou « variant naturel » pour désigner une souche obtenue principalement par mutation et sélection

à partir de la souche de référence ; tandis que le terme « mutant » sera plus spécifiquement réservé à une souche obtenue par des techniques de mutagénèse dirigée, notamment par transformation génétique à l'aide de vecteurs, appliquées à la souche de référence.

5 Selon un mode de réalisation, la souche naturelle et/ou le variant naturel sont résistants à un analogue toxique d'oligopeptides transporté par le système de transport des oligopeptides AMI.

En particulier, ledit analogue toxique pourra être choisi parmi l'aminoptérine, la triornithine et la trilycine. Cet analogue sera de
10 préférence l'aminoptérine.

On qualifiera ici de « résistance à l'aminoptérine », le fait que l'on observe, en présence d'un disque de papier imbibé de 200 µg d'aminoptérine, un diamètre d'inhibition inférieur ou égal à environ 2 cm, de préférence inférieur ou égal à environ 1,8 cm, sur une boîte
15 encemencée par 100 µl de suspension bactérienne saturée.

Une telle définition sera étendue *mutatis mutandis* par l'homme du métier à d'autres analogues toxiques d'oligopeptides transportés par le système AMI à la lumière de ses connaissances générales. Ainsi, l'homme du métier sera à même de faire varier les valeurs maximales des
20 diamètres d'inhibition de manière appropriée en fonction des analogues toxiques considérés.

De préférence, une souche conforme à la présente invention est choisie parmi :

- la souche déposée à la CNCM le 10 mai 2004 sous le numéro I-3211 ;
- 25 - la souche déposée à la CNCM le 16/09/04 sous le numéro I- 3301 ;
- la souche déposée à la CNCM le 16/09/04 sous le numéro I-3302 ;
- la souche déposée à la CNCM le 24/01/02 sous le numéro I-2774.

A titre d'exemple de caractéristiques acidifiantes intéressantes au sens de la présente invention, et comme le montrent les
30 exemples suivants, on précisera que la souche AMI déficiente I-3302 (variant de la souche-mère AMI fonctionnelle I-3299 déposée à la

CNCM le 16/09/04) permet d'obtenir une variation de pH de 0,29 entre le pH de fin d'incubation et le pH du produit en fin de vie, tandis que la souche-mère AMI fonctionnelle I-3299 donne lieu à une variation de pH de 0,56 entre ces deux temps. En ce cas, l'avantage
5 d'utiliser une souche AMI déficiente par rapport à une souche AMI fonctionnelle réside donc dans une réduction de 0,27 de la variation de pH entre la fin d'incubation et la fin de vie du produit.

Comme indiqué supra, les variants AMI déficients sont obtenus à partir d'une souche-mère de référence. Ainsi, dans le
10 cadre de la présente invention, il s'agira de variants naturels obtenus par exemple par mutation et sélection selon leurs propriétés acidifiantes. Les techniques pour ce faire sont connues, de même que les tests permettant de contrôler les propriétés acidifiantes (notamment Spinnier H.E., Corrieu G., 1989).

15 A la différence des souches I-3211, I-3301, et I-3302, qui sont des variants naturels AMI déficients de souches-mères AMI fonctionnelles (voir la partie expérimentale ci-après), la souche I-2774 a été isolée et identifiée par la Demanderesse comme étant naturellement AMI déficiente.

20 Les souches selon l'invention sont particulièrement intéressantes pour la préparation de produits alimentaires fermentés.

De manière préférée, de tels produits alimentaires fermentés sont des produits laitiers ou végétaux.

Par « produit laitier », on entend désigner selon la présente
25 invention, en plus du lait, les produits dérivés du lait, tels la crème, la crème glacée, le beurre, le fromage, le yoghourt ; les produits secondaires, comme le lactosérum, la caséine ; ainsi que n'importe quel aliment préparé contenant, comme ingrédient principal, du lait ou des constituants du lait (par exemple des laits infantiles).

30 Par « produit végétal », on entend désigner, entre autres, des produits obtenus à partir d'une base végétale telle que, par exemple, les

jus de fruits et les jus végétaux parmi lesquels le jus de soja, le jus d'avoine ou le jus de riz.

En outre, les définitions ci-dessus de « produit laitier » et « produit végétal » couvrent chacune n'importe quel produit à base d'un mélange
5 de produits laitiers et végétaux, tels qu'un mélange de lait et de jus de fruits, par exemple.

Ainsi, la présente invention concerne également un procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté dans lequel un substrat est mis en fermentation avec au moins une souche vivante telle que décrite
10 supra.

Il est avantageux de prévoir, dans ce procédé, l'utilisation d'une association d'une ou plusieurs souches bactériennes telles que décrites précédemment, avec notamment au moins une autre souche de bactérie vivante.

15 Avantageusement, ladite autre souche de bactérie est une souche de bactérie lactique, telle que *Streptococcus* spp. ; *Lactobacillus* spp., notamment *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* et *L. casei* ; *Lactococcus* spp. et *Bifidobacterium* spp.

De préférence, on choisira le substrat à mettre en œuvre dans le
20 cadre du procédé susmentionné parmi : les substrats lactés, notamment le lait ; les substrats à base de matières premières végétales, telles les fruits, les céréales et le soja. On pourra ainsi notamment envisager :

- si le substrat est lacté, le lait naturel ou reconstitué, écrémé ou non, ou bien des milieux à base de lait ou de produit(s) d'origine
25 laitière. ; et
- si le substrat est à base de matières premières végétales, des jus de fruits et/ou des jus végétaux.

Le substrat peut en outre avantageusement comporter des éléments couramment utilisés dans l'industrie agro-alimentaire pour la
30 préparation de produits fermentés, notamment de desserts lactés, en particulier des éléments solides tels que des fruits, pépites de

chocolat ou céréales par exemple, mais également des produits additionnels sucrés ou chocolatés liquides.

La présente invention concerne en outre des produits alimentaires fermentés, dont les propriétés organoleptiques sont conservées au cours du stockage. L'expression « propriétés organoleptiques conservées au cours du stockage » signifie ici que les propriétés organoleptiques des produits ne varient pas (ou pas de manière significative pour le consommateur) au cours du temps, au moins jusqu'à la date limite de consommation (DLC) des produits, voire avantageusement au-delà de cette date.

Selon un mode de réalisation, de tels produits comprennent au moins une souche vivante conforme à l'invention.

Selon un autre mode de réalisation, les produits alimentaires fermentés selon l'invention sont susceptibles d'être obtenus par le procédé décrit ci-dessus.

De manière préférée, les produits alimentaires fermentés selon l'invention contiennent au moins un ingrédient alimentaire bioactif (ou ingrédient alimentaire fonctionnel), notamment choisi parmi des protéines, des peptides, des analogues ou des dérivés de ceux-ci.

L'expression « ingrédient alimentaire bioactif ou fonctionnel » désigne un ingrédient qui affecte avantageusement une ou plusieurs fonctions cibles de l'organisme, indépendamment de ses effets nutritionnels. Ainsi, l'effet d'un tel ingrédient peut être une amélioration de l'état de santé et/ou du bien-être et/ou une réduction des risques d'apparition de maladies chez un consommateur qui ingère des quantités normales dudit ingrédient.

Cette définition peut être étendue à l'aliment ou au produit contenant un tel ingrédient, ledit aliment ou produit pouvant dès lors être lui-même qualifié de bioactif ou fonctionnel.

On entend par « analogue », n'importe quelle version modifiée d'un composé initial, ici une protéine ou un peptide, ladite version modifiée

pouvant être naturelle ou synthétique, dans laquelle un ou plusieurs atomes, tels que des atomes de carbone, d'hydrogène, d'oxygène, ou des hétéroatomes tels que l'azote, le soufre ou un halogène, ont été ajoutés ou supprimés de la structure du composé initial, de manière à obtenir un
5 nouveau composé moléculaire.

Un « dérivé » au sens de l'invention est n'importe quel composé qui présente une ressemblance ou un motif structural en commun avec un composé de référence (protéine ou peptide). Entrent également dans cette définition, d'une part les composés qui, seuls ou avec d'autres
10 composés, peuvent être des précurseurs ou des produits intermédiaires dans la synthèse d'un composé de référence, moyennant une ou plusieurs réactions chimiques, et d'autre part les composés qui peuvent être formés à partir dudit composé de référence, seul ou avec d'autres composés, via une ou plusieurs réactions chimiques.

15 Sont ainsi couverts par la définition de « dérivés » ci-dessus au moins les hydrolysats, notamment tryptiques, de protéines et/ou peptides, les fractions d'hydrolysats, ainsi que les mélanges d'hydrolysats et/ou de fractions d'hydrolysats.

Parmi les ingrédients alimentaires bioactifs susceptibles d'être
20 utilisés dans les produits alimentaires fermentés selon la présente invention, on peut citer, à titre d'exemples non limitatifs, le peptide 91-100 de la caséine α_{s1} (voir le brevet européen EP 0 714 910), le peptide C6- α_{s1} 194-199 (voir le brevet américain US 6 514 941), le peptide C7- β 177-183 (voir le brevet américain US 6 514 941), le peptide C12- α_{s1} 23-34 (voir
25 le brevet US américain 6 514 941), les caséinophosphopeptides, l' α -casomorphine, la caséine α exorphine, la casokinine, la β -casomorphine, les caséinomacropéptides (CMP) et les glycomacropéptides (GMP), la casoxine, les casoplatellines, les fragments 50-53, les β -lactorphines, la lactoferroxine, les peptides Val-Pro-Pro (voir le brevet européen
30 EP 0 583 074), Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro-Gln (voir la demande EP 0 737 690), Tyr-Lys-Val-Pro-Gln-Leu (voir la demande EP 0 737 690),

Tyr-Pro (voir la demande EP 1 302 207 et le brevet EP 0 821 968), Ile-Pro-Pro (voir Nakamura *et al.*, 1995 ; et brevet japonais JP 6 197 786), des fragments, analogues, dérivés de ceux-ci, des protéines et/ou peptides les contenant, et leurs combinaisons (pour une revue, voir 5 notamment la Danone World Newsletter N°17 de septembre 1998).

Le tableau 1 ci-après liste les principaux peptides fonctionnels libérés par l'hydrolyse des protéines du lait humain et du lait de vache.

Tableau 1

Protéines originelles	Peptides fonctionnels*	Origine du lait**		Activités décrites
caséine α	α casomorphine caséine α exorphine casokinine		V V V	activité opiacée activité opiacée activité antihypertensive
caséine β	β casomorphine casokinine CPP	H H H	V V V	activité opiacée activité immunomodulatrice + activité antihypertensive action sur les minéraux
caséine κ	CMP=GMP casoxine casoplatellines		V V	modulation de la motricité gastrointestinale et de la libération d'hormones digestives antagoniste opiacé activité antithrombotique
α lactalbumine	fragments 50-53	H	V	activité opiacée
β lactoglobuline	β lactorphines		V	activité opiacée + activité antihypertensive
lactoferrine lactoransferrine	lactoferroxine	H	V	antagoniste opiacé

(*) les séquences des acides aminés ne sont pas exactement les mêmes

(**) H: lait humain / V: lait de vache

10 Le tableau 2 ci-après recense les principales activités physiologiques des peptides fonctionnels issus du lait connus à ce jour.

Tableau 2

Activités	Peptides	In vitro	In vivo animal	In vivo homme	Réf.	
Effet sur la digestion	Caséinomacropéptide (CMP)	production de CCK par cellule intestinale de rat	Veau: après ingestion de CMP (210 mg/kg), inhibition de la sécrétion gastrique et diminution de la concentration plasmatique en CKK Lapin après introduction dans lumen: effet antisecrétoire sur l'iléon Chien: après administration intragastrique, modulation de l'insulinémie post-prandiale; annulation de cet effet par la naloxone	Homme: après ingestion de CMP (4g), diminution de la sécrétion acide	Beucher 1994 Yvon 1994	
	β casomorphines				Ben Mansour 1988	
	β casomorphines naturelles et certains de leurs analogues	Plusieurs effets au niveau de l'iléon de lapin				Schusdziarra 1983
	Analogues de β casomorphines non métabolisés	Stimulation de l'absorption intestinale d'électrolytes				Tomé 1987, 1988 - Mahé 1989
	Caséine			Chien: administration 10g caséine/300mL eau par sonde intragastrique: inhibition de la motilité du grêle, annulée par la naloxone.vs. 10g de protéine de soja: pas d'effet		Ben Mansour 1988
						Defilippi 1995

Tableau 2 (suite)

Activités	Peptides	In vitro	In vivo animal	In vivo homme	Réf.
Effet antimicrobien	Lactoferricine Casocidine I (caséine α S ₁) -165-203	Inhibition de la croissance des souches pathogènes			Tomita 1994 - Zucht 1995
	Fragment caséine α S ₁ B (1-23 N terminal) = isracidine	Inhibition de la croissance des souches pathogènes	Souris, Mouton: efficace en injection IM contre <i>Staphylococcus aureus</i>		Lahov 1996
	Fragment caséine β humaine		Souris: effet protecteur en injection IV contre <i>K. pneumoniae</i>		Migliore-Samour 1989
Effet immuno-modulateur	Fragments de α lactalbumine bovine et de caséine κ bovine	Prolifération des lymphocytes humains (PBL) activés par Con A			Kayser 1996
	β casokinine 10 et β casomorphine 7 de synthèse	Prolifération ou suppression des PBL suivant concentration			Kayser 1996
	Caséine β humaine 54-59 α lactalbumine 51-53	Stimulation de la phagocytose des globules rouges de mouton par les macrophages péritonéaux de souris			Parker 1984
	Caséine β bovine Caséine 191-193 Caséine 63-68	Stimulation des macrophages péritonéaux de la souris		Pas de protection <i>in vivo</i>	Migliore-Samour 1988
	Caséine κ bovine Caseino-maclopeptides (106-169)	Inhibition de la prolifération des lymphocytes B des plaques de Peyer chez souris et lapin			Otani 1992, 1995

Tableau 2 (suite)

Activités	Peptides	In vitro	In vivo animal	In vivo homme	Ref.
Effet antithrombotique	Caséinoglycopeptide bovin (bCGP)			CGP isolé dans le plasma de nouveau-nés après ingestion de lait infantile ou lait de mère	Chabance 1995
	Caséinoglycopeptide humain (hCGP)				Jollès 1986
	Peptide 106-116 de caséine κ bovine	Inhibition de l'agrégation plaquettaire			Raha 1988
	Tétrapéptide de lactotransferrine humaine (39-42)	Inhibition de l'agrégation plaquettaire	Rat et cobaye avec thrombose artérielle expérimentale: après injection IV, activité antithrombotique		Drouet 1990
Effet antihypertenseur	Hydrolysats enzymatiques de β lactoglobuline et d' α lactalbumine	Inhibition de l'ACE			Mullaly 1997
	Fragments synthétiques de caséine β humaine	Inhibition de l'ACE	Rats recevant de l'angiotensine I: après injection IV, retour au niveau initial de pression artérielle		Kohmura 1989
	Peptides de lait fermenté par <i>L. helveticus</i> et <i>S. cerevisiae</i>		Rats hypertendus: ingestion de 10 mL lait fermenté / kg poids corporel, on retrouve les peptides dans l'aorte avec inhibition de l'ACE		Masuda 1996
	Peptides issus de lair fermenté par <i>L. helveticus</i>		Rats hypertendus: après ingestion, diminution de la pression artérielle		Yamamoto 1994
	Peptides issus de la fermentation de lait par <i>L. helveticus</i> + <i>S. cerevisiae</i> Val-Pro-Pro (VPP) / II-Pro-Pro (IPP)		Rats hypertendus: après ingestion, diminution de la pression artérielle Rats normaux: pas d'effet		Nakamura 1995
				Homme hypertendu (36 sujets): après 8 semaines d'ingestion de 95 mL/j, diminution de la pression artérielle	Hata 1996

Tableau 2 (suite)

Activités	Peptides	In vitro	In vivo animal	In vivo homme	Réf.
Effets opiacés	β casomorphines		<p>Rats: après injection intra-carotides, accumulation de β casomorphines dans la zone sans barrière hématoencéphalique</p> <p>Veaux nouveaux-nés: après leur premier repas de lait de vache, β casomorphines dans le sang</p> <p>Mini-porcs: après ingestion de caséine bovine, β casomorphine isolée du chyme duodénal</p> <p>Chiots: après ingestion de lait de mère, existence de β casomorphines dans le sang</p>		<p>Ermisch 1983</p> <p>Umbach 1985</p> <p>Meisel 1986</p> <p>Singh 1989</p>
	<p>Peptides de caséine β humaine de synthèse</p> <p>Casoxines (caséine κ) bovine et humaine</p>	<p>Effet opioïde sur iléon isolé de cobaye annulé par la naloxone</p> <p>Effets opioïdes antagonistes sur muscle de l'iléon isolé de cobaye</p>		<p>Homme: après ingestion de lait de vache, présence de β casomorphines dans le contenu intestinal grêle mais pas dans le sang d'adulte</p>	<p>Svedberg 1985</p> <p>Teschemacher 1986</p> <p>Yoshikawa 1986</p> <p>Chiba 1989</p>

Avantageusement, les produits alimentaires selon l'invention sont des aliments fonctionnels.

Comme indiqué brièvement supra, par « aliment fonctionnel », on entend désigner un produit alimentaire qui affecte avantageusement une ou plusieurs fonctions cibles de l'organisme, indépendamment de ses effets nutritionnels. Il peut ainsi en résulter une amélioration de l'état de santé et/ou du bien-être et/ou une réduction des risques d'apparition de maladies chez un consommateur qui ingère des quantités normales dudit produit. A titre d'exemples d'activités d'un « aliment fonctionnel », on citera notamment des activités anti-cancéreuses, immunostimulatrices, promotrices de la santé osseuse, anti-stress, opiacées, anti-hypertension, amélioratrices de la biodisponibilité du calcium, ou encore anti-microbiennes.

De tels aliments fonctionnels peuvent être destinés à l'homme et/ou aux animaux.

Selon un mode de réalisation, les produits alimentaires objets de l'invention sont des produits frais.

Selon un autre mode de réalisation, les produits alimentaires visés par la présente invention sont notamment choisis parmi : une boisson ; un yoghourt ou une crème dessert ; un lait ou un jus fermenté.

La culture des souches selon l'invention, pures ou en association avec d'autres souches, peut également être utilisée comme probiotique dans l'alimentation humaine ou animale, ou encore comme ferment lactique, par exemple dans le cadre du procédé décrit plus haut.

En outre, la présente invention concerne l'utilisation d'au moins une souche naturelle de *S. thermophilus* AMI déficiente à post-acidification réduite, et/ou d'un ou plusieurs variants naturels de celle-ci, également AMI déficient(s) à post-acidification réduite, et/ou de leurs cultures et fractions de cultures biologiquement pures, pour

préparer des produits alimentaires fermentés dont les propriétés organoleptiques sont conservées au cours du stockage.

La présente invention est illustrée par les figures suivantes :

- 5 - Figure 1 : courbes de cinétiques d'acidification de la souche-mère AMI fonctionnelle I-3299 et de la souche AMI déficiente I-3301.
Lait : lait sans hydrolysat de caséine ; lait + N3 0,2 g/L : lait additionné de 0,2 g d'ingrédient N3 (ref 211693, Difco, USA) par litre de lait.
- 10 - Figure 2 : courbes de cinétiques d'acidification de la souche-mère AMI fonctionnelle I-3299 et de la souche AMI déficiente I-3302.
Lait : lait sans hydrolysat de caséine ; lait + N3 0,2 g/L : lait additionné de 0,2 g d'ingrédient N3 par litre de lait.
- 15 - Figure 3 : courbes de cinétiques d'acidification de la souche AMI déficiente I-3301 en présence de quantités variables d'ingrédient N3.
Lait : lait sans hydrolysat de caséine ; lait + 0,05 N3 : lait additionné de 0,05 g d'ingrédient N3 par litre de lait ; lait + 0,1 N3 : lait additionné de 0,1 g d'ingrédient N3 par litre de lait ; lait + 0,2 N3 : lait additionné de 0,2 g d'ingrédient N3 par litre de lait ; lait + 0,4 N3 : lait additionné de 0,4 g d'ingrédient N3 par litre de lait ; lait + 0,8 N3 : lait additionné de 0,8 g d'ingrédient N3 par litre de lait.
- 20 - Figure 4 : courbes de cinétiques d'acidification de la souche AMI déficiente I-3302 en présence de quantités variables d'ingrédient N3.
Lait : lait sans hydrolysat de caséine ; lait + 0,05 N3 : lait additionné de 0,05 g d'ingrédient N3 par litre de lait ; lait + 0,1 N3 : lait additionné de 0,1 g d'ingrédient N3 par litre de lait ; lait + 0,2 N3 : lait additionné de 0,2 g d'ingrédient N3 par litre de lait ; lait + 0,4 N3 : lait additionné de 0,4 g d'ingrédient N3 par litre de lait ; lait + 0,8 N3 : lait additionné de 0,8 g d'ingrédient N3 par litre de lait.
- 25 - Figure 5 : courbes de cinétiques d'acidification obtenues à partir de la fermentation du lait après addition d'acides aminés avec la souche-mère AMI fonctionnelle I-1630 (déposée à la CNCM le 24/10/95) et la souche AMI déficiente I-3211.
- 30

Nom de la souche sans autres précisions : fermentation en lait ; nom de la souche + aa : fermentation réalisée en lait additionné de 20 acides aminés (correspondant au 1/40^{ème} de la quantité déterminée pour le milieu chimiquement défini adapté à *S. thermophilus* (Letort et
5 *al.*, 2001).

- Figure 6 : courbes de cinétiques obtenues en lait additionné d'ingrédient N3.

- Figure 7 : courbes de cinétiques d'acidification réalisées avec différents mélanges d'ingrédients.

10 D'autres caractéristiques et avantages de la présente invention apparaîtront à la lecture des exemples figurant dans la partie expérimentale ci-après et donnés à titre purement illustratif.

PARTIE EXPERIMENTALE

15

I. Matériels et Méthodes:

I.1. Obtention de variants AMI déficients :

20

a) Evaluation de la biodiversité de la résistance à l'aminoptérine chez *S. thermophilus*

Dans un premier temps, la sensibilité des souches de *S. thermophilus* à l'aminoptérine a été vérifiée. Pour ce faire, 200 µg d'aminoptérine ont été
25 déposés sur un disque placé sur une boîte de pétri contenant du milieu Elliker sur lequel ont été déposés 100 µL de suspension bactérienne. Si la souche est sensible, un diamètre d'inhibition apparaît autour du disque après une incubation d'une nuit.

Les souches-mères I-1630 (déposée auprès de la CNCM le 24/10/95) et I-
30 3299 (déposée auprès de la CNCM le 16/09/04) ont été sélectionnées car elles possèdent des propriétés de texture intéressantes. La souche I-1630 ne possède pas de protéase de paroi, tandis que la souche I-3299 en

possède une. Ces deux souches ont donc des propriétés de croissance très différentes.

Tableau 3

5

Souche	Date de dépôt CNCM	Diamètre d'inhibition (cm)
I-1477	22/09/94	2
I-1520	30/12/94	2,1
I-1630	24/10/95	2,1
I-3211	10/05/94	1,5
I-2130	24/02/99	2
I-2774	24/01/02	1,8
I-3299	16/09/04	2,3
I-3301	16/09/04	1,5
I-3302	16/09/04	0

Une sensibilité différente a été observée en fonction des souches.

Dans le tableau 3, les variants AMI déficients obtenus sont indiqués en gris dans les cadres grisés, le cas échéant, en association avec leur souche-mère respective.

10

La résistance à l'aminoptérine est plus forte pour les variants que pour la souche-mère correspondante.

La souche sauvage I-2774 présente une résistance naturelle à l'aminoptérine, traduisant sa déficience dans le système de transport AMI.

15

b) Obtention des variants AMI déficients

Les protocoles de sélection de variants déficients pour le transport des peptides, utilisant un analogue peptidique toxique, ont déjà été décrits (Higgins et Gibson, 1986).

Brièvement, une gamme d'aminoptérine allant de 0 à 200 µg/mL a été réalisée en milieu chimiquement défini (MCDaa) adapté à la croissance de *S. thermophilus* et contenant les 20 acides aminés libres comme source d'azote.

25

A partir d'une préculture réalisée en MCDaa, tous les tubes de la gamme ont été ensemencés à 1%. Après une incubation de trois jours à 37°C, 100 µL de chaque tube de culture ont servi à réaliser un tapis bactérien sur une gélose de milieu Elliker. Un disque sur lequel sont déposés
5 200 µg d'aminoptérine a été placé au centre de la boîte. Les boîtes ont ensuite été incubées trois jours à 37°C en anaérobiose.

La présence de clones dans la zone d'inhibition a ensuite été observée, et une vingtaine de clones ont été prélevés afin d'ensemencer 5 mL de milieu Elliker.

10 Les clones qui sont repartis dans ce milieu et ont donné une suspension bactérienne après 16H00 d'incubation à 37°C ont permis la réalisation d'un tapis à la surface d'une gélose de milieu Elliker sur lequel a été déposé un disque imprégné de 200 µg d'aminoptérine.

Tous les clones obtenus ont ensuite été testés en fermentation dans du
15 lait. La cinétique d'acidification a fourni une information quant à la capacité de ces variants à acidifier le lait.

I.2. Préparation du lait :

20 Le lait a été reconstitué avec 120 g de poudre de lait écrémé, dans 930 mL d'eau. Après 30 minutes d'hydratation, le lait a été pasteurisé 30 minutes à 95°C.

L'ingrédient N3 a été ajouté à partir d'une solution à 10 % réalisée dans de l'eau puis stérilisée par filtration à 0,22 µm.

25 Les autres ingrédients testés ont été ajoutés au lait avant la pasteurisation.

La solution d'acides aminés a été réalisée dans l'eau puis stérilisée par filtration à 0,22 µm.

I.3. Préparation des ferments pour la réalisation des suivis d'acidification :

Une préculture a été réalisée dans du lait stérilisé avec autolysat de levure
ensemencé à 1%, incubée 18h à 42°C. Ensuite, le ferment a été réalisé
5 dans 100 mL de lait stérilisé avec autolysat incubé à 42°C et arrêté en le
plaçant dans l'eau glacée quand l'acidité de 80°D était atteinte. Le ferment
était conservé à 4°C jusqu'au lancement du suivi d'acidification.

Pour le lancement du suivi d'acidification, 250 mL de lait ont été
ensemencés à 1 % avec le ferment de *S. thermophilus*.

10

I.4. Matériels :

N3 : protéose peptone N°3, réf R211693, Difco, USA (hydrolysat de
caséine contenant des peptides et, principalement, des acides aminés
15 libres)

Poudre de lait: Milex 240, Arla Food Ingredients

Autolysat de levure: extrait de levure, ref AEB171109, AES Laboratoires
CINAC pour le suivi d'acidification : Système automatique de mesure
de l'activité acidifiante développé par G. Corrieu LGMPA, marque
20 YSEBAERT

Alaco 7014 : hydrolysat de protéines de lactosérum, NZMP Gmbh,
Siemens Strasse, 6-14 D-25462, Rellingen, Allemagne.

MPH 955 : hydrolysat de caséine, NZMP Gmbh, Siemens Strasse, 6-14
D-25462, Rellingen, Allemagne.

25 DSE 6441 : hydrolysat de protéine de lactosérum, NZMP Gmbh, Siemens
Strasse, 6-14 D-25462, Rellingen, Allemagne.

MPH 917 : hydrolysat de caséine, NZMP Gmbh, Siemens Strasse, 6-14
D-25462, Rellingen, Allemagne.

30 WPH 926 : hydrolysat de protéine de lactosérum, NZMP Gmbh, Siemens
Strasse, 6-14 D-25462, Rellingen, Allemagne.

MPH 948 : hydrolysat de caséine, NZMP Gmbh, Siemens Strasse, 6-14
D-25462, Rellingen, Allemagne.

C 12 : hydrolysat de protéine de lait, DMV international NCB Laan 80, P.O. BOX 13 5460, Ba Zeghel, Pays-Bas.

MPH 910 : hydrolysat de caséine, NZMP GmbH, Siemens Strasse, 6-14 D-25462, Rellingen, Allemagne.

5

II. Résultats :

II.1. Cinétique d'acidification de la souche-mère AMI fonctionnelle I-3299 et de souches AMI déficientes qui en dérivent, en présence ou non d'ingrédient N3

10

On observe, sur les figures 1 et 2, que la souche-mère AMI fonctionnelle I-3299 présente la même cinétique en présence ou en absence d'ingrédient N3 dans le lait.

15 En revanche, les souches AMI déficientes présentent des cinétiques différentes.

II.2. Cinétique d'acidification avec des quantités variables d'ingrédient N3, souche AMI déficiente I-3301

20 La souche I-3301 a une cinétique dont la latence est plus courte en présence d'ingrédient N3. En outre, le pH obtenu en fin de fermentation est d'autant plus élevé qu'il y a d'ingrédient N3 dans le milieu.

II.3. Cinétique d'acidification avec des quantités variables d'ingrédient N3, souche AMI déficiente I-3302

25 La cinétique d'acidification est d'autant plus rapide qu'il y a d'ingrédient N3 dans le milieu. En outre, le pH obtenu en fin de cinétique est d'autant plus bas qu'il y a d'ingrédient N3 dans le milieu.

II.4. Résultats de post-acidification en souche pure (par comparaison avec la souche-mère I-3299)

Tableau 4

Temps (J)	pH I-3302	pH I-3299
pH fin d'incubation	4,70	4,70
pH à J28 (10°C)	4,41	4,14
δ pH	0,29	0,56

- 5 La souche AMI déficiente permet d'avoir une différence (delta) de pH de 0,29 entre le pH de fin d'incubation et le pH du produit en fin de vie, alors que la souche-mère donne lieu à un delta de pH de 0,56.

L'avantage d'utiliser la souche AMI déficiente est de 0,27 unité pH si l'on compare les δ pH dans ces conditions.

10

II.5. Cinétiques d'acidification obtenues à partir de la fermentation du lait après addition d'acides aminés avec la souche-mère AMI fonctionnelle I-1630 (déposée à la CNCM le 24/10/95) et la souche AMI déficiente I-3211 qui en dérive.

15

La stimulation produite par l'addition d'acides aminés libres dans le lait est la même pour la souche-mère et la souche AMI déficiente. Ce résultat semble logique dans la mesure où les acides aminés libres représentent la seule source d'azote disponible dans ces conditions pour les deux

20 souches.

II.6. Cinétiques obtenues en lait additionné d'ingrédient N3

La souche-mère AMI fonctionnelle I-1630 (déposée à la CNCM le 24/10/95), est clairement stimulée par l'addition d'ingrédient N3 dans le lait, alors que la souche AMI déficiente qui en dérive ne l'est pas. Les

25 peptides de l'hydrolysat N3 sont utilisables par la souche-mère, mais ne le sont pas par la souche AMI déficiente.

II.7. Cinétiques d'acidification réalisées avec différents ingrédients avec la souche AMI déficiente I-3211

Les hydrolysats MPH955 et WPH926 stimulent le mieux la fermentation
5 de la souche AMI déficiente dans le lait. Ce sont également les deux hydrolysats dont les teneurs en petits peptides et acides aminés libres sont les plus élevées.

REFERENCES

- Garault, P., *et al.*, (2002) Journal of Biological Chemistry **277**:32-39
- 5 Letort *et al.*, (2001) J. Appl. Microbiol. **91**:1023-1029
- Letort, C., *et al.*, (2002) Applied and Environmental Microbiology **68**:3162-3165
- Spinnier H.E., *et al.* Automatic method to quantify starter activity based on pH measurement" J. of Dairy Research, 56 (1989) 755-764); de
- 10 Roissart H. et Luquet F.M. Edition Loriga ISBN : 2-9507477-0-1
- Kayser *et al.*, (1996) FEBS Letters **383**, 18-20
- Hata Y. *et al.*, (1996) Am. J. Clin. Nutr. **64**, 767-71
- Nakamura Y. *et al.*, (1995) J. Dairy Sci. **78**, 1253-7
- Migliore-Samour D. *et al.*, (1988) Experimentia **44**, 188-93
- 15 Defilippi C. *et al.*, (1995) Nutr. **11**, 751-4
- Tomé D. *et al.*, (1987) Am. J. Physiol. **253**, G737-44
- Tomé D. *et al.*, (1988) Reprod. Nutri. Dévelop. **28**, 909-18
- Ben Mansour A. *et al.*, (1988) Pediatr. Res. **24**, 751-5
- Mahé S. *et al.*, (1989) Reprod. Nutri. Dévelop. **29**, 725-32
- 20 Schusdziarra V. *et al.*, (1983) Diabetologia **24**, 113-6
- Yvon M. *et al.*, (1994) Reprod. Nutri. Dévelop. **34**, 527-37
- Zucht H.D., *et al.*, (1995) FEBS Letters **372**, 185-8
- Tomita M. *et al.*, (1994) Acta Paed. Jap. **36**, 585-91
- Lahov E. *et al.*, (1996) Food Chem. Toxic. **34**, 131-145
- 25 Migliore-Samour D. *et al.*, (1989) Int. Dairy Res. **56**, 357-62
- Jollès P. *et al.*, (1986) Europ. J. Biochem. **158**, 379-82
- Raha S. *et al.*, (1988) Blood **772**, 172-8
- Chabance B. *et al.*, (1995) Brit. J. Nut. **73**, 582-90
- Kohmura M. *et al.*, (1989) Agric. Biol. Chem. **53**, 2107-14
- 30 Masuda O. *et al.*, (1996) J. Nutr. **126**, 3063-8
- Yamamoto N. *et al.*, (1994) Biosci. Biotech. Biochem. **58**, 776-8

- Ermisch A. *et al.*, (1983) *J. Neurochem.* **41**, 1229
- Umbach M. *et al.*, (1985) *Regul. Pept.* **12**, 223-30
- Singh M., *et al.*, (1989) *Pediatr. Res.* **26**, 34-8
- Svedberg J. *et al.*, (1985) *Peptides* **6**, 825-30
- 5 Teschemacher H., *et al.*, (1986) *J. Dairy Res.* **53**, 135-8
- Yoshikawa M. *et al.*, (1986) *Agric. Biol. Chem.* **50**, 2419-21
- Chiba H. *et al.*, (1989) *J. Dairy Sci.* **72**, 363
- Beucher S. *et al.*, (1994) *J. Nutr. Biochem.* **5**, 578-84
- Parker F. *et al.*, (1984) *Eur. J. Biochem.* **45**, 677-82
- 10 Otani H. *et al.*, (1992) *Milchwiss.* **47**, 512-5
- Otani H. *et al.*, (1995) *J. Dairy Res.* **62**, 339-48
- Drouet *et al.*, (1990) *Nouv. Rev. Fr. Hermatol.* **32**, 59-62
- Mullaly M. *et al.*, (1997) *Int. Dairy J.* **7**, 299-303
- Meisel H. *et al.*, (1986) *FEBS Letters* **196**, 223-7
- 15 Danone World Newsletter N°17 (septembre 1998)
- Higgins C.F. *et* Gibson M.M., (1986) Peptide transport in bacteria.
Methods in Enzymology **125**, 365-377

REVENDICATIONS MODIFIÉES
reçues par le Bureau international le 20
March 2006 (20.03.2006)

REVENDICATIONS

1. Souche naturelle de *Streptococcus thermophilus* AMI déficiente à post-acidification réduite, et ses variants naturels AMI déficients ayant des caractéristiques d'acidification du lait similaires, ainsi que leurs cultures et fractions de cultures biologiquement pures, à l'exclusion de la souche déposée à la CNCM le 24/01/02 sous le numéro I-2774.
2. Souche selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est résistante à un analogue toxique d'oligopeptides transporté par le système AMI.
3. Souche selon la revendication 2, caractérisée en ce que ledit analogue toxique est l'aminoptérine.
4. Souche selon la revendication 3, caractérisée en ce que le diamètre d'inhibition observé en présence d'un disque de papier imbibé de 200 µg d'aminoptérine est inférieur ou égal à environ 2 cm, de préférence inférieur ou égal à environ 1,8 cm, sur une boîte encemencée par 100 µl de suspension bactérienne saturée.
5. Souche selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce qu'elle est choisie parmi :
 - la souche déposée à la CNCM le 10/05/04 sous le numéro I-3211 ;
 - la souche déposée à la CNCM le 16/09/04 sous le numéro I-3301 ;
 - la souche déposée à la CNCM le 16/09/04 sous le numéro I-3302.
6. Souche selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que lesdits variants naturels AMI déficients sont obtenus par mutation et sélection de leurs propriétés acidifiantes.

7. Procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté dans lequel un substrat est mis en fermentation avec au moins une souche vivante selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que la fermentation est effectuée en présence d'au moins une autre souche de bactérie vivante.

9. Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que ladite autre souche de bactérie est une bactérie lactique.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ladite bactérie lactique est choisie parmi : *Streptococcus* spp. ; *Lactobacillus* spp, notamment *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* et *L. casei* ; *Lactococcus* spp. et *Bifidobacterium* spp.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisé en ce que ledit substrat est choisi parmi : les substrats lactés, notamment le lait ; les substrats à base de matières premières végétales, telles les fruits, les céréales et le soja.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que ledit substrat contient des éléments solides.

13. Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que lesdits éléments solides sont choisis parmi : les fruits, les produits chocolatés et les céréales.

14. Produit alimentaire fermenté comprenant au moins une souche vivante selon l'une quelconque des revendications 1 à 6.

15. Produit alimentaire fermenté susceptible d'être obtenu par un procédé selon l'une quelconque des revendications 7 à 13.
16. Produit alimentaire fermenté selon la revendication 14 ou 15, caractérisé en ce qu'il est un produit laitier ou végétal.
17. Produit alimentaire fermenté selon l'une quelconque des revendications 14 à 16, caractérisé en ce qu'il contient au moins un ingrédient alimentaire bioactif.
18. Produit alimentaire fermenté selon la revendication 17, caractérisé en ce que ledit ingrédient alimentaire bioactif est choisi parmi des protéines, des peptides, des analogues ou des dérivés de ceux-ci.
19. Produit alimentaire fermenté selon la revendication 17 ou 18, caractérisé en ce qu'il est un aliment fonctionnel.
20. Produit alimentaire fermenté selon l'une quelconque des revendications 14 à 19, caractérisé en ce qu'il est un produit frais.
21. Produit alimentaire fermenté selon l'une quelconque des revendications 14 à 20, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi : une boisson ; un yoghourt ou une crème dessert ; un lait ou un jus fermenté.
22. Produit alimentaire fermenté selon l'une quelconque des revendications 14 à 21, caractérisé en ce que ses propriétés organoleptiques sont conservées au cours du stockage.
23. Utilisation d'au moins une souche selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 comme ferment lactique.

24. Utilisation d'au moins une souche selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 comme probiotique dans l'alimentation humaine ou animale.

25. Utilisation d'au moins une souche selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour préparer des produits alimentaires fermentés dont les propriétés organoleptiques sont conservées au cours du stockage.

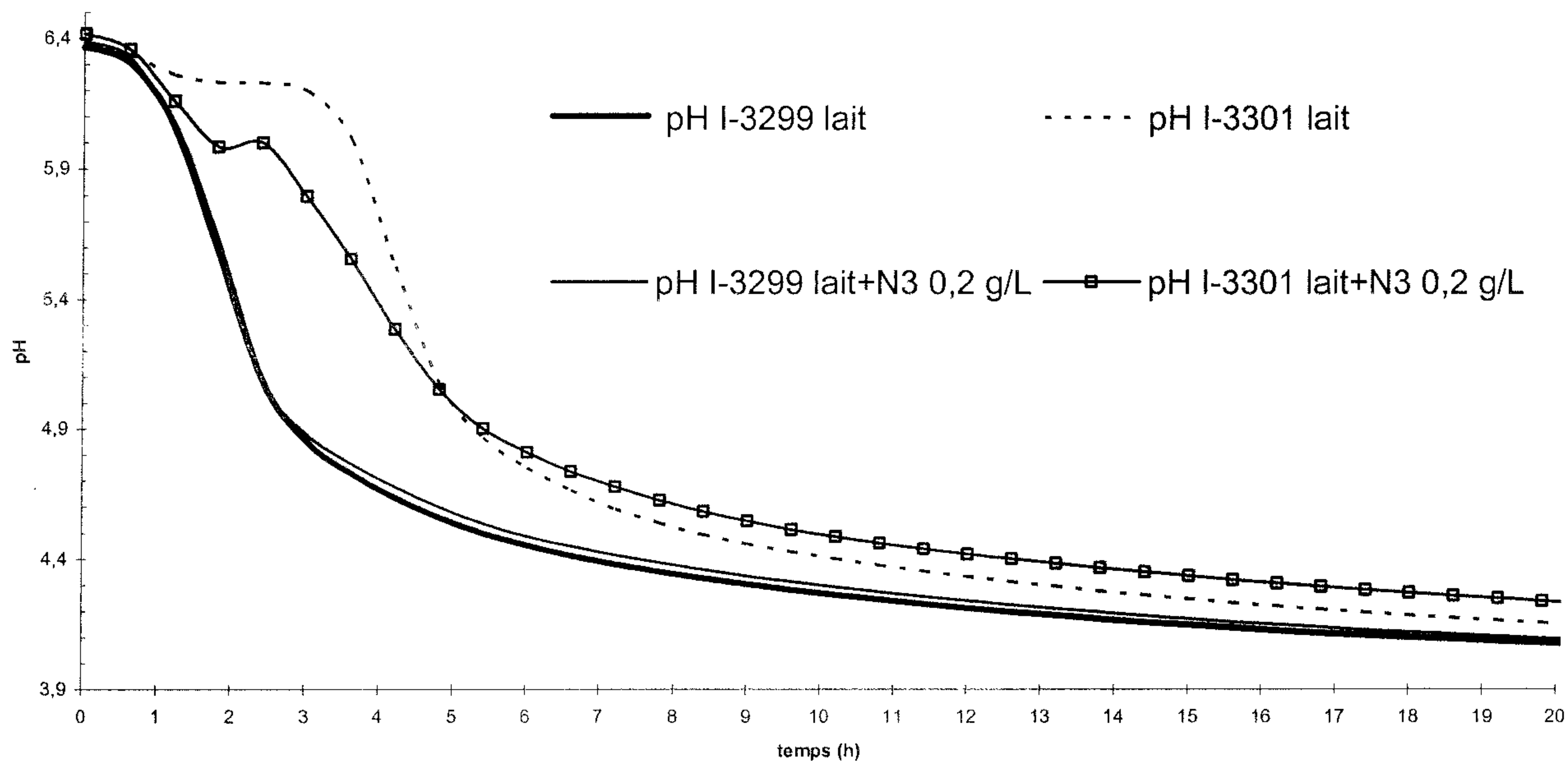


Fig.1

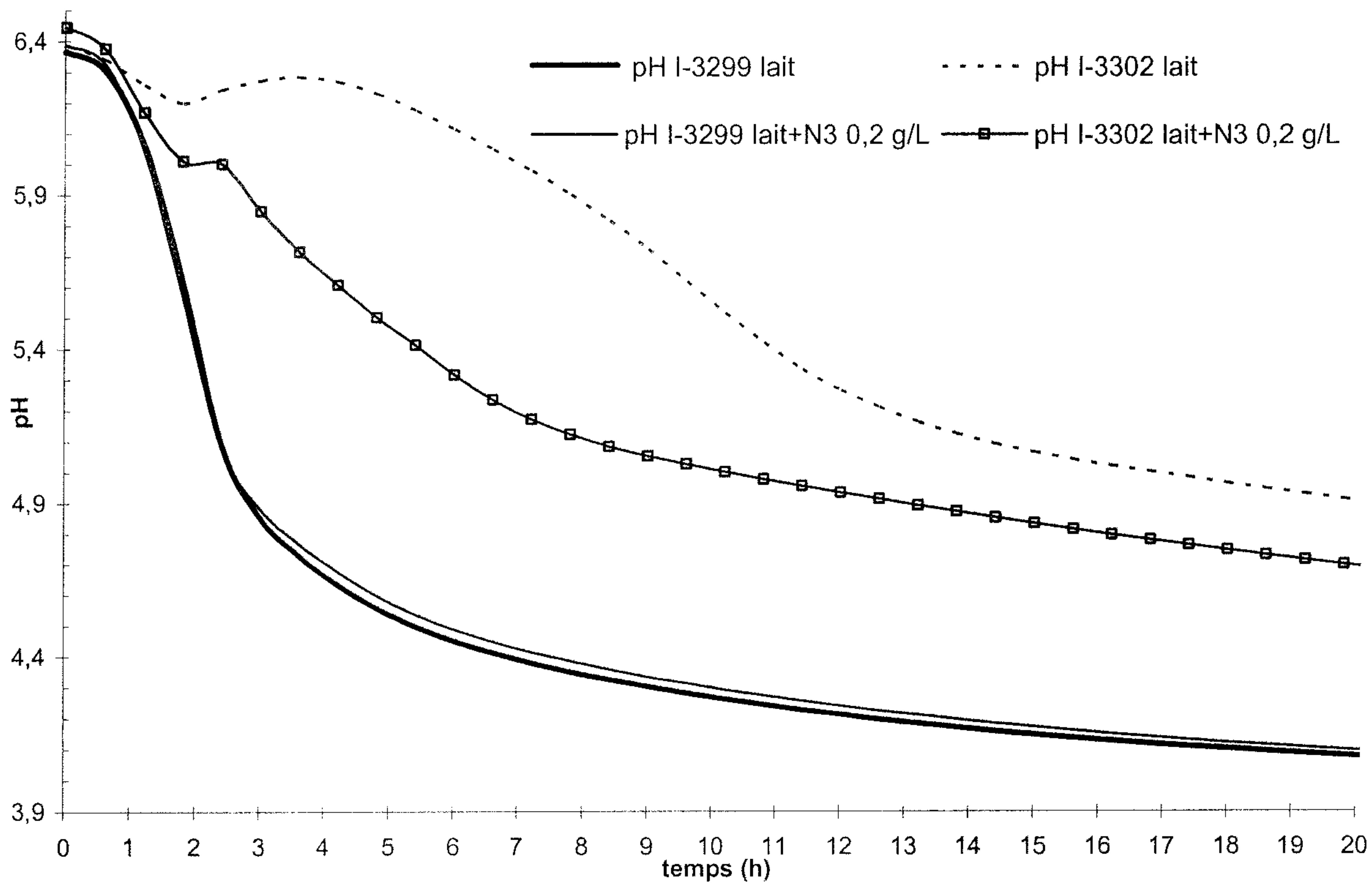


Fig. 2

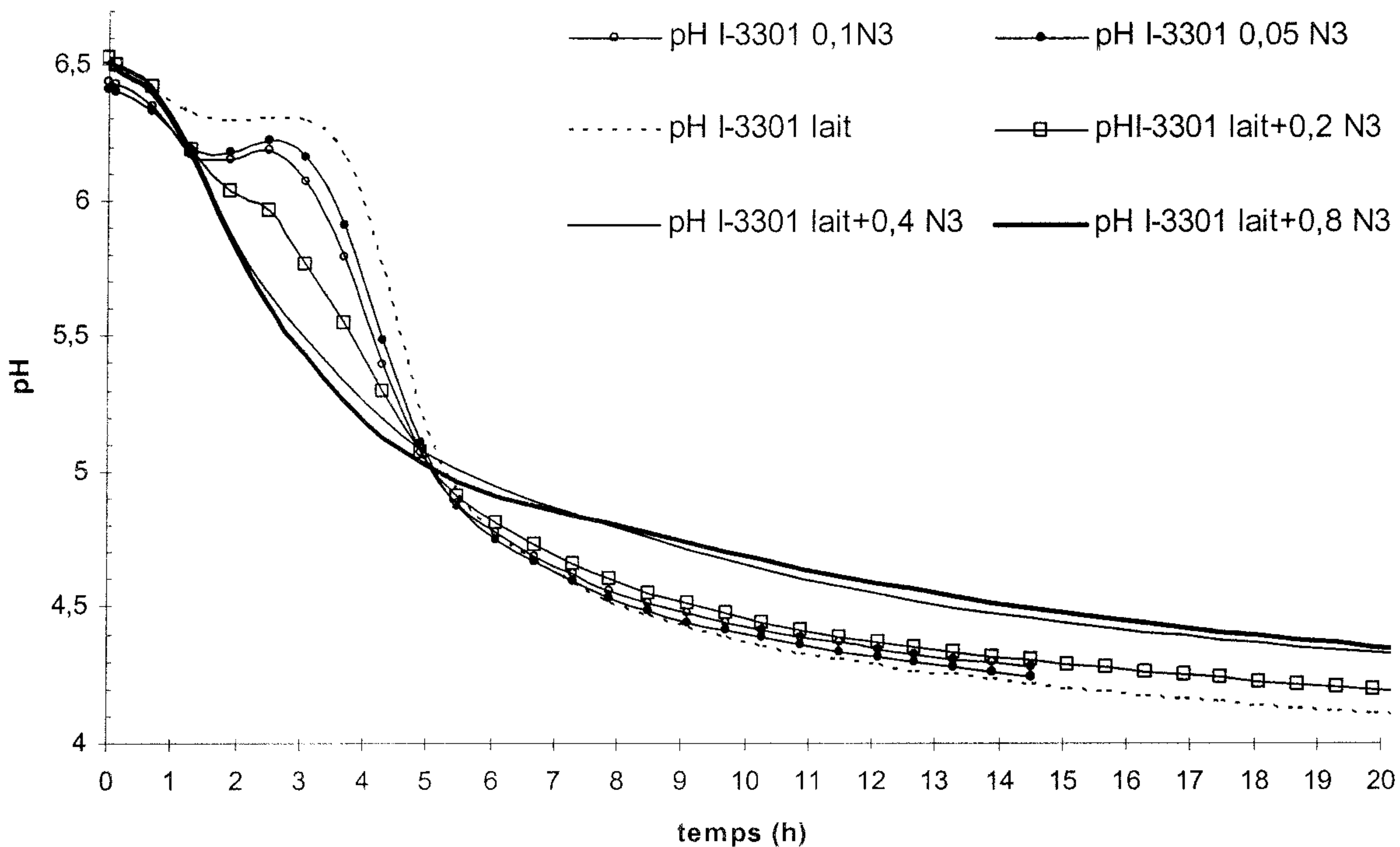


Fig.3

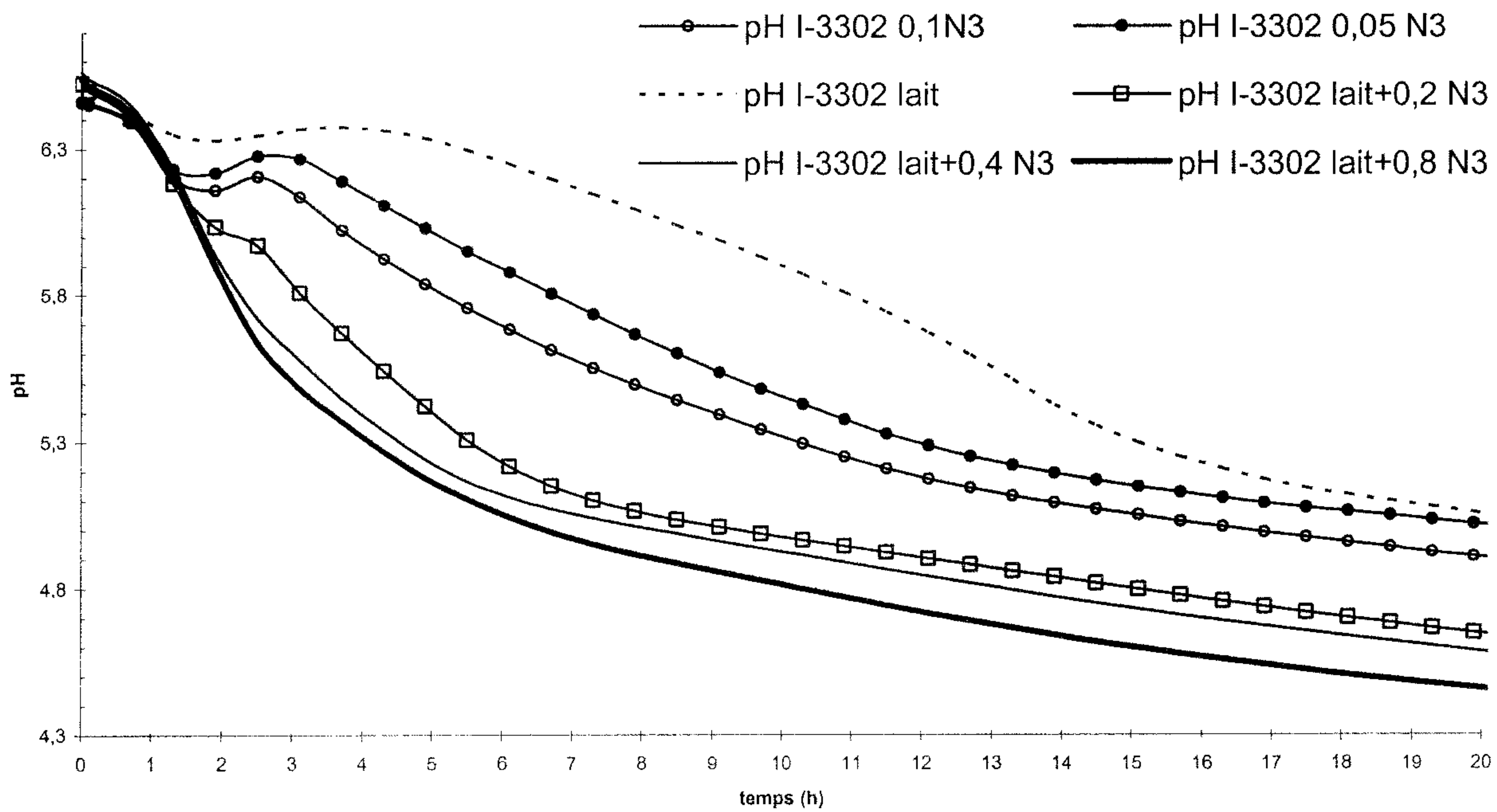


Fig. 4

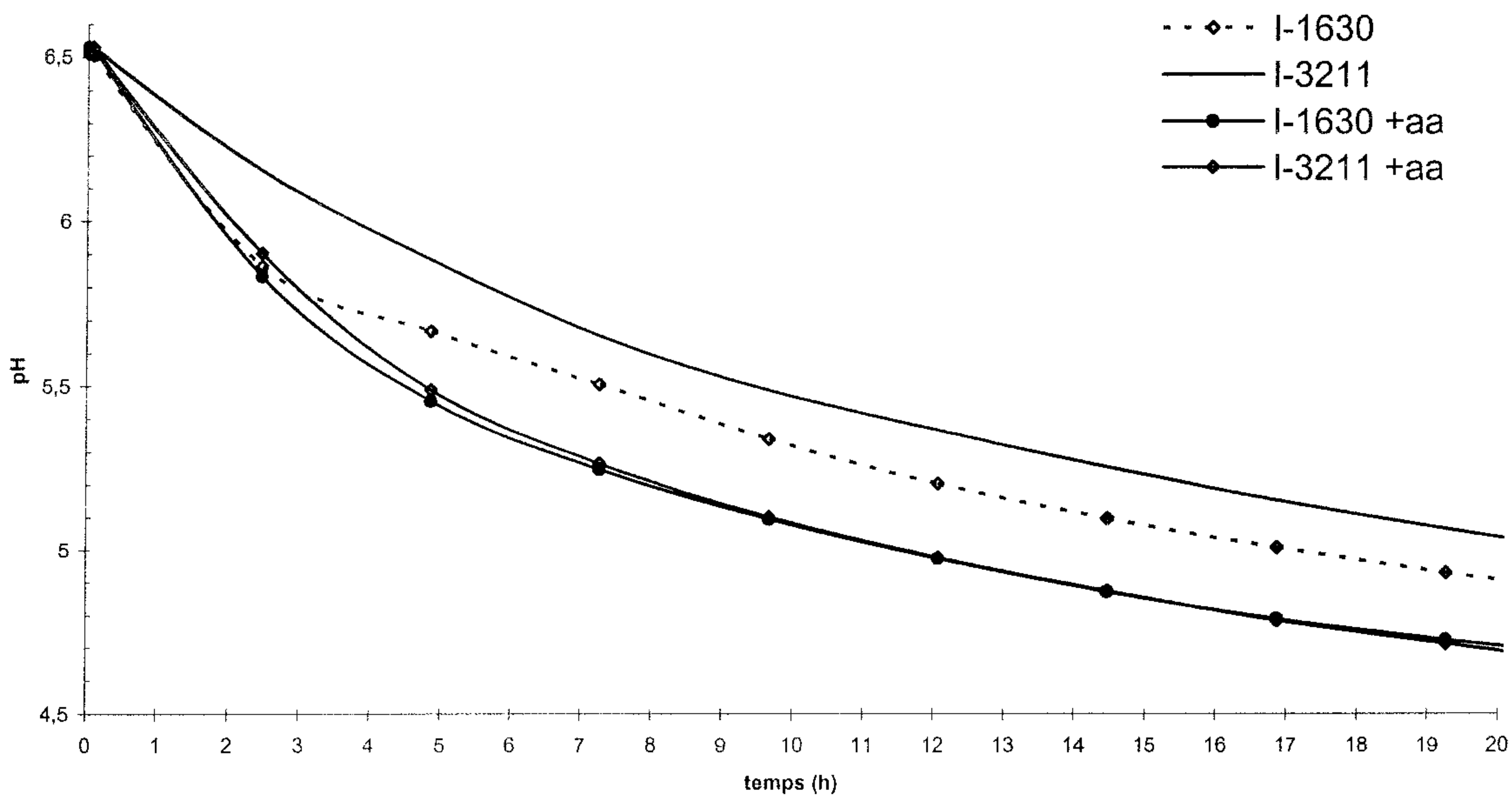


Fig. 5

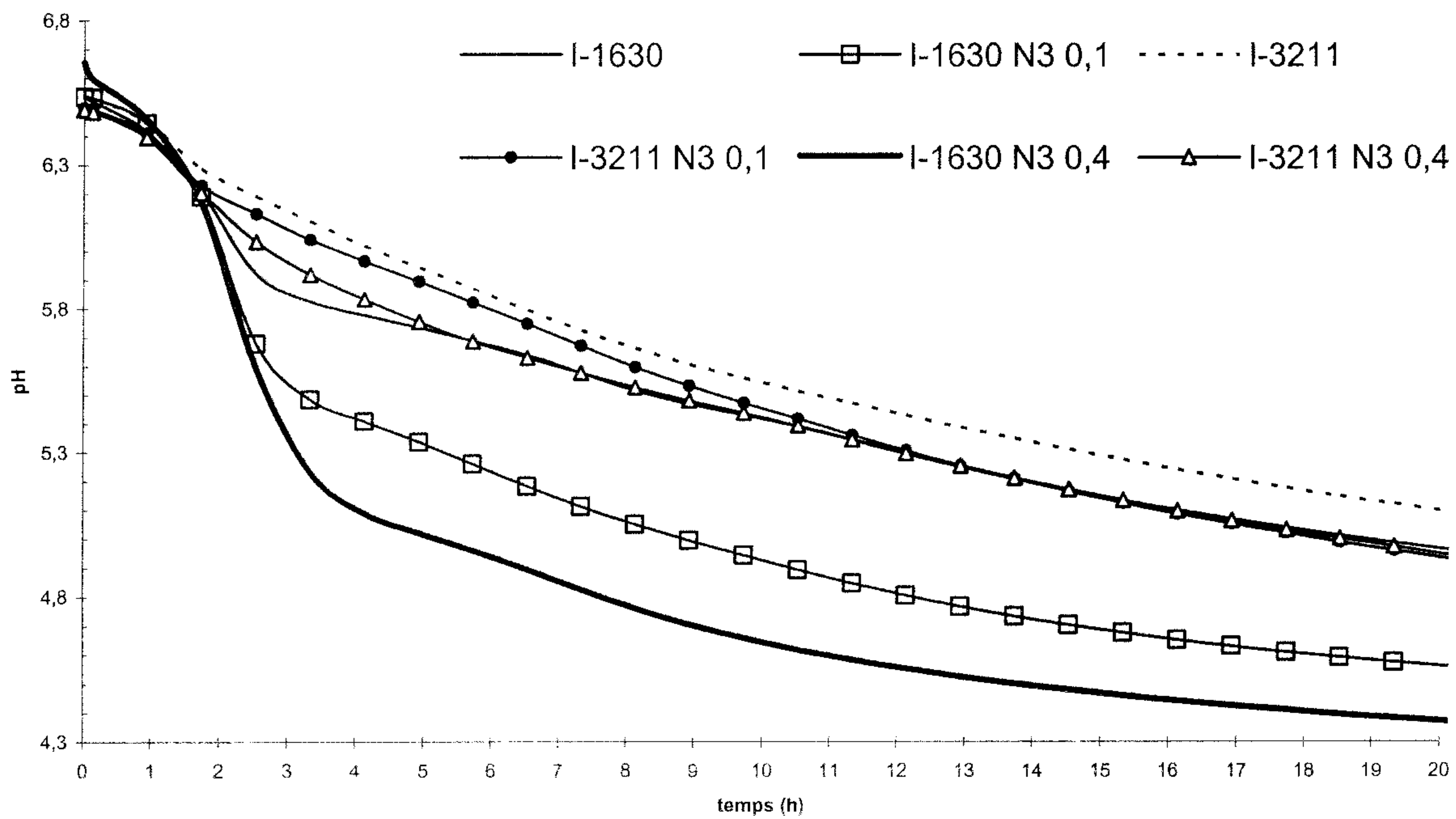


Fig. 6

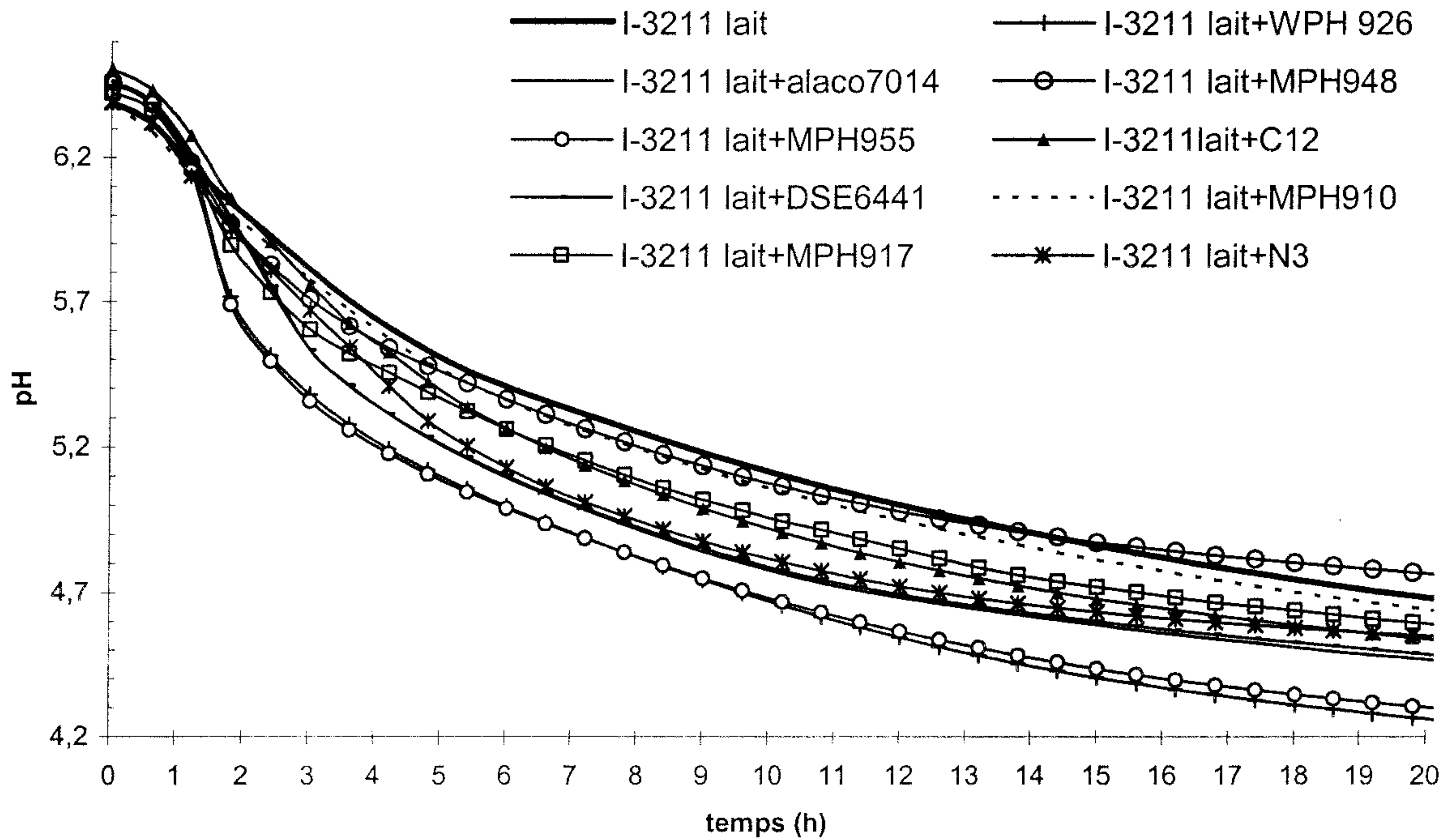


Fig. 7