

(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
13 août 2009 (13.08.2009)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2009/098411 A2

(51) Classification internationale des brevets :
A23C 9/123 (2006.01) A23C 9/12 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2008/001679

(22) Date de dépôt international :
3 décembre 2008 (03.12.2008)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
FR 07 08451 4 décembre 2007 (04.12.2007) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :
COMPAGNIE GERVAIS DANONE [FR/FR]; 17,
Boulevard Haussmann, F-PARIS 75009 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **PERRIER, Louise** [FR/FR]; 1, rue Mirabeau, F-91270 Vigneux sur Seine (FR). **LOYSANCE-PAROUX, Catherine** [FR/FR]; 11, allée de l'Arrentis, F-35520 La Mezière (FR). **TIRILLY, Yves** [FR/FR]; Route Croix du Rosier, F-29470 Plougastel-Daoulas (FR). **FUHRMANN, Benoit** [FR/FR]; 33, rue de la Garenne, F-78690 Les Essarts Le Roi (FR).

(74) Mandataires : **VIALLE-PRESLES, Marie-José** et al.;
Cabinet Ores, 36, rue de Saint-Petersbourg, F-75008 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, 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, LY, MA, MD, ME, 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, ST, 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), eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport (règle 48.2.g))

(54) Title : USE OF *L. CASEI* SSP. *PARACASEI* AS ANTIFUNGAL AGENT

(54) Titre : UTILISATION DE *L. CASEI* SSP. *PARACASEI* COMME ANTIFONGIQUE

(57) Abstract : The invention relates to the use of *L. casei ssp. paracasei* for imparting antifungal properties to a fermented dairy product, and particularly for inhibiting the growth of moulds of the Ascomycetes class in said product.

(57) Abrégé : L'invention est relative à l'utilisation de *L. casei ssp. paracasei* pour conférer des propriétés antifongiques à un produit laitier fermenté, et notamment pour inhiber la croissance de moisissures de la classe des Ascomycètes dans ledit produit.



WO 2009/098411 A2

Utilisation de *L. casei* ssp. *paracasei* comme antifongique.

La présente invention est relative à l'utilisation de *Lactobacillus casei* pour protéger un produit laitier contre le développement des moisissures.

L'utilisation de microorganismes sélectionnés dans le but d'améliorer la conservation des aliments est connue depuis des millénaires. Parmi ces microorganismes, on citera les bactéries lactiques, qui sont largement utilisées pour la conservation de produits laitiers, de produits carnés, ou de produits d'origine végétale, destinés à l'alimentation humaine ou animale. L'amélioration de la conservation des aliments par les bactéries lactiques repose en grande partie sur leur capacité à produire, au cours de la fermentation, de l'acide lactique et d'autres acides organiques, qui inhibent la croissance des microorganismes indésirables (bactéries et moisissures) en abaissant le pH du milieu, le rendant défavorable à la croissance de ces microorganismes, et/ou qui ont un effet toxique direct sur ceux-ci. Outre ces acides organiques, certaines bactéries lactiques produisent des substances anti-fongiques et/ou anti-bactériennes, telles que le peroxyde d'hydrogène, le diacétyl, ou la nisine.

La Demande EP 0221499 décrit des propriétés antifongiques de *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* NRRL-B-15972. Lorsque cette bactérie est cultivée sur milieu d'agar additionné de jus de concombre, elle est capable d'inhiber totalement la croissance de *Chaetomium olivaceum*, et partiellement celle d'*Aspergillus terreus* et de *Verticillium* sp. En revanche, dans ces conditions, elle n'a aucun effet sur la croissance de *Penicillium oxalicum* ; un effet inhibiteur sur ce microorganisme est toutefois observé avec des cultures de cette bactérie sur jus de concombre, à un pH de l'ordre de 3,7.

La Demande EP 0576780 décrit les effets antifongiques de *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* LC-705. Des cultures de cette bactérie, obtenues sur un milieu à base de lactosérum, additionné d'hydrolysate de caséine et d'extrait

de levure, peuvent inhiber la croissance de *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, et *Candida*.

La Demande PCT WO 97/36603 décrit les effets antifongiques de *Lactobacillus casei* ssp. *casei* N94/49432. Des cultures de cette bactérie, obtenues sur un milieu synthétique additionné d'extrait de levure, ont un effet antifongique sur *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Cunninghamella*, *Dothiorella*, *Geotrichum*, *Phoma*, et *Phomopsis*.

La Demande EP 1308506 décrit les effets antifongiques et antibactériens d'une combinaison de *Propionibacterium jensenii* avec certaines souches de *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei*.

Les Inventeurs ont maintenant constaté que des bactéries de l'espèce *Lactobacillus casei* ssp. *paracasei* possédaient une activité antifongique, notamment sur les moisissures du genre *Penicillium*, lorsqu'elles étaient utilisées isolément, c'est-à-dire sans être associées à d'autres bactéries antifongiques, et notamment avec *Propionibacterium jensenii*.

Cette activité antifongique présente les caractéristiques suivantes :

Elle ne se développe pas lorsque *L. casei* est cultivé sur milieu synthétique, mais apparaît lorsque *L. casei* est cultivé sur du lait, ou un milieu à base de lait, à partir de 5 heures de culture. Elle devient maximale après 24 à 48h de fermentation.

Elle est sensible au pH. Elle disparaît en dessous de pH 4, mais ré-apparaît toutefois si le pH est remonté au dessus de 4.

Elle est également sensible à la chaleur. Elle disparaît après un traitement thermique de 1 minute à 60°C.

Elle n'est d'autre part pas liée à la production d'acides organiques tels que les acides sorbique, propionique ou benzoïque (qui sont connus pour leur activité antifongique), ni à celle de peroxyde d'hydrogène, ces substances n'étant pas détectables dans les cultures de *L. casei* ssp. *paracasei* dotées de propriétés anti-fongiques.

La présente invention a pour objet l'utilisation d'une bactérie de l'espèce *L. casei* ssp. *paracasei* pour conférer des propriétés antifongiques à un produit laitier fermenté.

En particulier, la présente invention a pour objet un procédé pour inhiber le développement d'une moisissure de la classe des Ascomycètes, et notamment du genre *Penicillium*, dans un produit laitier fermenté, caractérisé en ce qu'il comprend la fermentation d'un substrat laitier en présence d'une bactérie de l'espèce *L. casei* ssp. *paracasei* pendant un temps suffisant pour l'apparition dans le substrat d'une activité antifongique. Cette activité antifongique a pour effet d'inhiber le développement de ladite moisissure en cas de contamination dudit produit par celle-ci postérieurement à la fermentation.

Avantageusement, la quantité de ladite bactérie de l'espèce *L. casei* ssp. *paracasei* utilisée pour ensemercer le substrat laitier pour ladite fermentation est d'au moins 10^6 , de préférence au moins 10^7 , et avantageusement comprise entre 10^7 et 10^8 u.f.c. par gramme de substrat laitier.

Selon un mode de mise en œuvre préféré du procédé conforme à l'invention, la fermentation dudit substrat laitier est effectuée pendant au moins 5 heures, de préférence pendant au moins 15 heures, et de manière tout à fait préférée pendant 24 à 48 heures. Pour obtenir une activité antifongique en utilisant des temps de fermentation courts, il est préférable d'utiliser une quantité relativement importante de *L. casei* ssp. *paracasei* ; par exemple, pour observer une activité antifongique après 5 heures de fermentation du substrat laitier, l'ensemencement sera effectué à raison d'au moins 10^7 u.f.c. par gramme de substrat laitier.

Selon un autre mode de mise en œuvre préféré du procédé conforme à l'invention, il comprend, si nécessaire l'ajustement du pH du substrat fermenté à une valeur supérieure à 4, de préférence comprise entre 4 et 6,5.

Avantageusement ladite bactérie de l'espèce *L. casei* ssp. *paracasei* est une bactérie de la souche CNCM I-1518. Cette souche est décrite notamment dans la Demande

EP0794707 ; elle a été déposée, selon les dispositions du Traité de Budapest, le 30 décembre 1994, auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes), 25 rue du Docteur Roux, à Paris.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples illustrant l'activité antifongique d'une souche de *L. casei* ssp. *paracasei*.

EXEMPLE 1 : MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE DE PRODUITS LAITIERS FERMENTES EN PRESENCE DE *L. CASEI* SSP. *PARACASEI*.

Un produit laitier fermenté contenant *L. casei* ssp. *paracasei* (Actimel®, contenant la souche CNCM I-1518 associée à *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*), et un produit laitier fermenté contenant *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* (Témoin) ont été inoculés avec 6 espèces fongiques à raison de 10^2 spores: *Mucor circinelloides* (2 souches testées) ; *Mucor plumbeus* ; *Penicillium expansum* ; *Penicillium roqueforti* ; *Penicillium brevicompactum*.

Ces espèces sont représentatives des contaminations habituellement rencontrées sur les produits laitiers frais.

Les produits sont ensuite incubés à 10°C et examinés tous les 7 jours pour l'apparition de thalles de croissance fongique.

On observe un développement important des espèces de *Mucor* sur les deux produits, dès 14 jours dans le cas d'Actimel®, et dès 7 jours dans le cas du produit témoin. En revanche, on observe une croissance extrêmement faible (agrégats) ou une absence de croissance visible de *Penicillium* sur Actimel®, après 40 jours d'incubation, alors que l'on observe un envahissement de la surface du produit Témoin en seulement 14 jours.

Dans une seconde série d'expérimentations, l'activité antifongique de la souche CNCM I-1518 a été évaluée par une technique dérivée de celle des antibiogrammes. Elle consiste à géloser le produit à tester (80% de produit + 20% de solution d'agar à 15g/l) et à couler le mélange en boîte de Pétri.

Sur le milieu solidifié, on dépose 3 disques en papier stériles sur lesquels sont déposées 100 spores de la moisissure à tester (*P. expansum*. LMSA 00 083)

Les boîtes de Pétri sont incubées à 25°C et à 10°C. Le diamètre du thalle fongique est mesuré régulièrement.

Les produits qui ont été testés sont les suivants : Actimel® ; mix laitier d'Actimel® avec *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, sans la souche CNCM I-1518 ; mix laitier d'Actimel® sans *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, fermenté pendant 24 heures en présence de la souche CNCM I-1518.

Les résultats de deux essais pour chacune des conditions testées sont illustrés dans le Tableau I ci-dessous.

TABLEAU I

	Diamètre de thalle après incubation (mm)		Diamètre de thalle (mm) après 17 jours à 10°		Diamètre de thalle après 24 jours à 10°	
	Essai 1 8 jours à 25°C	Essai 2 7 jours à 25°C	Essai 1	Essai 2	Essai 1	Essai 2
Actimel® Standard (commerce)	17,6 ± 4,4	19,2 ± 4,8	9,6 ± 0,5	10 ± 0,9	10,9 ± 0,8	12,9 ± 1,8
Actimel® sans <i>L. casei</i>	>65	>65	>65	>65	>65	>65
Mix laitier d'Actimel® fermenté 24h avec <i>L. casei</i> en l'absence de <i>S. thermophilus</i> et <i>L. bulgaricus</i>	9,4 ± 1	8,8 ± 1	11,4 ± 1	15,1 ± 1,2	14,1 ± 0,9	17,2 ± 1,2

Les deux produits contenant la souche CNCM I-1518 (Actimel® ; et le mix laitier d'Actimel® fermenté 24h avec *L. casei* en l'absence de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* présentent une activité antifongique, contrairement au produit qui ne la contient pas (mix laitier d'Actimel® sans *L. casei*).

EXEMPLE 2 : CINETIQUE D'APPARITION DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE AU COURS DE LA FERMENTATION PAR *L. CASEI* SSP. *PARACASEI*.

Des tests d'activité antifongique ont été effectués sur un mélange (Mix) constitué de lait écrémé, additionné de 2% de glucose et de 6% de protéines laitières (Protéines de lait écrémé classiques),ensemencé avec 10⁷cfu/ml de la souche CNCM I-1518 sous forme lyophilisée. Des échantillons de mélange ont été prélevés avant et après inoculation par CNCM I-1518, puis après 15h, 24h, 48h, et 72h de fermentation.

Préalablement aux tests d'activité antifongique, les échantillons prélevés et congelés ont été irradiés à 10 kG afin de bloquer le développement des bactéries ceci afin d'éviter leur développement et métabolisme au cours du test. Les échantillons à tester sont préalablement décongelés et le pH des échantillons a été ajusté à 6,2 (pH du mélange de départ). Les tests ont été effectués comme décrit à l'Exemple 1 ci-dessus.

Les résultats de ces tests (mesure du diamètre du thalle) sont illustrés par le Tableau II ci-dessous. Les mentions « Thalle sur disque » et « Agrégats », se réfèrent à des traces de croissance fongique, observées uniquement sur le disque.

TABLEAU II
Test 7 jours à 25°C

Mix nonensemencé	Mix + <i>L. casei</i>				
	To	T15h	T24h	T48h	T72h
36,8mm ± 10,2	22,5mm ± 3,1	19,3mm ± 2,7	Agrégats	Agrégats	Agrégats

Test 19 jours à 10°C

Mix nonensemencé	Mix + <i>L. casei</i>				
	To	T15h	T24h	T48h	T72h
48,5mm ± 1,9	13,8mm ± 3,3	Thalle sur disque	Agrégats	Agrégats	Agrégats

Ces essais montrent l'apparition précoce de l'activité antifongique, qui semble parfois faiblement présente dès l'inoculation mais n'apparaît nettement qu'à partir de 15h de fermentation et devient maximale entre 24h et 48h. Cette activité est toujours présente après 48h et même 72h sous réserve que le pH soit supérieur à 4.

EXEMPLE 3 : SENSIBILITE DE L'ACTIVITE ANTIFONGIQUE AU pH

Des tests d'activité antifongique ont été effectués dans les mêmes conditions que dans l'Exemple 2 ci-dessus, mais sans ajustement du pH préalablement aux tests.

Les résultats sont illustrés par le Tableau III ci-dessous.

TABLEAU III

	Mix nonensemencé	Mix + <i>L. casei</i>				
		To	T15h	T24h	T48h	T72h
pH	6,32	6,01	5,63	4,8	3,94	3,75
	33,2 ± 2,5	12,8 ± 1,3	Agrégats	Agrégats	34,3 ± 11,4	25,2 ± 2,1

Ces résultats montrent que le pouvoir antifongique est altéré lorsque le pH est inférieur à 4.

Cette altération semble toutefois réversible, le pouvoir antifongique étant restauré si le pH est ramené à une valeur supérieure à 4.

EXEMPLE 4 : INFLUENCE DU MILIEU DE FERMENTATION SUR L'ACTIVITE ANTI-FONGIQUE.

Afin de déterminer si l'activité antifongique était liée au milieu de culture, des essais ont été effectués en utilisant comme milieu de culture d'une part le mélange laitier décrit à l'exemple 2, et d'autre part un milieu synthétique, de composition suivante : peptone 10gr/L ; extrait de viande 10gr/L ; extrait de levure 5gr/L ; Phosphate bipotassique 2gr/L ; Citrate d'ammonium 2gr/L ; Sulfate de magnésium 0,1gr/L ; Sulfate de manganèse 0,05 gr/L ; Glucose 20gr/L ; Tween 80 : 1ml ; qsp 1 L eau permutée. Ces milieux ont été ensemencés avec 10^7 cfu/ml de la souche CNCM I-1518 sous forme lyophilisée. Après 24 et 48 heures de culture, l'activité antifongique a été testée, comme décrit à l'Exemple 2, pendant 7 jours à 25°C et 20 jours à 10°C.

Lorsque la culture est effectuée sur le mélange laitier, on observe une inhibition complète de la croissance fongique quelque soit la température du test. En revanche, aucune inhibition n'est observée lorsque la culture est effectuée sur le milieu synthétique, ceci pour une population bactérienne équivalente.

REVENDICATIONS

1) Utilisation d'une bactérie de l'espèce *L. casei* ssp. *paracasei* pour conférer des propriétés antifongiques à un produit laitier fermenté.

2) Procédé pour inhiber le développement d'une moisissure de la classe des Ascomycètes dans un produit laitier fermenté, caractérisé en ce qu'il comprend la fermentation d'un substrat laitier en présence d'une bactérie de l'espèce *L. casei* ssp. *paracasei* pendant un temps suffisant pour l'apparition dans le substrat d'une activité antifongique.

3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que la quantité de ladite bactérie de l'espèce *L. casei* ssp. *paracasei* utilisée pourensemencer le substrat laitier pour ladite fermentation est d'au moins 10^6 u.f.c. par gramme de substrat laitier.

4) Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que la quantité de ladite bactérie de l'espèce *L. casei* ssp. *paracasei* utilisée pourensemencer le substrat laitier pour ladite fermentation est d'au moins 10^7 u.f.c. par gramme de substrat laitier.

5) Procédé selon une quelconque des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que la fermentation dudit substrat laitier est effectuée pendant au moins 5 heures.

6) Procédé selon une quelconque des revendications 2 à 5, caractérisé en ce qu'il comprend, si nécessaire, l'ajustement du pH du substrat fermenté à une valeur supérieure à 4.

7) Procédé selon une quelconque des revendications 2 à 6, caractérisé en ce que ladite bactérie de l'espèce *L. casei* ssp. *paracasei* est une bactérie de la souche CNCM I-1518.

8) Procédé selon une quelconque des revendications 2 à 7, caractérisé en ce que ladite moisissure de la classe des Ascomycètes appartient au genre *Penicillium*.