



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 1999/05/17
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 1999/12/02
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2011/08/23
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2000/11/20
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 1999/001165
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 1999/061627
(30) Priorité/Priority: 1998/05/22 (FR98/06456)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 15/56* (2006.01),
A23C 9/123 (2006.01), *C12N 1/20* (2006.01),
C12N 9/38 (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
BENBADIS, LAURENT, FR;
BRIGNON, PIERRE, FR;
GENDRE, FRANCOIS, FR

(73) Propriétaire/Owner:
COMPAGNIE GERVAIS DANONE, FR

(74) Agent: ROBIC

(54) Titre : SOUCHES MUTANTES DE LACTOBACILLUS BULGARICUS DEPOURVUES D'ACTIVITE BETA-GALACTOSIDASE

(54) Title: MUTANT LACTOBACILLUS BULGARICUS STRAINS FREE FROM BETA-GALACTOSIDE ACTIVITY

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention concerne des souches mutantes de *L. bulgaricus* portant une mutation non-sens, dans au moins l'une des séquences codantes de l'opéron lactose, et dépourvues d'activité β -galactosidase, et des ferments lactiques comprenant lesdites souches. Ces souches et ferments peuvent être utilisés pour l'obtention de produits laitiers fermentés à partir de lait additionné de glucose.

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/56, A23C 9/123, C12N 1/20, 9/38 // (C12N 1/20, C12R 1:225)</p>	A2	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 99/61627 (43) Date de publication internationale: 2 décembre 1999 (02.12.99)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/01165 (22) Date de dépôt international: 17 mai 1999 (17.05.99) (30) Données relatives à la priorité: 98/06456 22 mai 1998 (22.05.98) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): COMPAGNIE GERVAIS DANONE [FR/FR]; 126-130, rue Jules Guesde, F-92302 Levallois Perret (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BENBADIS, Laurent [FR/FR]; 7, avenue de Provence, F-92160 Anthony (FR). BRIGNON, Pierre [FR/FR]; 7, rue des Brasseurs, F-67200 Strasbourg (FR). GENDRE, François [FR/FR]; 49, rue du Maréchal Foch, F-67200 Strasbourg (FR). (74) Mandataires: ORES, Béatrice etc.; Cabinet Orès, 6, avenue de Messine, F-75008 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</p>	
<p>(54) Title: MUTANT <i>LACTOBACILLUS BULGARICUS</i> STRAINS FREE FROM BETA-GALACTOSIDE ACTIVITY (54) Titre: SOUCHES MUTANTES DE <i>LACTOBACILLUS BULGARICUS</i> DEPOURVUES D'ACTIVITE BETA-GALACTOSIDASE (57) Abstract The invention concerns mutant <i>L. bulgaricus</i> strains bearing a nonsense mutation, in at least one of the sequences coding for the lactose operon, and free from β-galactosidase activity, and lactic starters comprising said strains. Said strains and starters can be used to obtain fermented milk products from glucose-added milk. (57) Abrégé L'invention concerne des souches mutantes de <i>L. bulgaricus</i> portant une mutation non-sens, dans au moins l'une des séquences codantes de l'opéron lactose, et dépourvues d'activité β-galactosidase, et des ferments lactiques comprenant lesdites souches. Ces souches et ferments peuvent être utilisés pour l'obtention de produits laitiers fermentés à partir de lait additionné de glucose.</p>		

SOUCHES MUTANTES DE *LACTOBACILLUS BULGARICUS* DÉPOURVUES
D'ACTIVITÉ BETA-GALACTOSIDASE.

Ces souches et ferments peuvent être utilisés pour l'obtention de produits laitiers fermentés à partir de lait additionné de glucose.

La présente Invention est relative à de nouveaux variants de *bulgaricus* et à leur utilisation pour la préparation de produits laitiers fermentés.

Les yoghourts sont traditionnellement obtenus par fermentation du lait avec une association de *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Au cours de la fermentation qui est effectuée à une température d'environ 40 à 45°C, ces bactéries utilisent principalement le lactose comme substrat énergétique, et produisent de l'acide lactique qui entraîne la coagulation du lait ; lorsque le pH atteint une valeur d'environ 4,8 à 4,5, on met fin à cette étape de fermentation (également dénommée « acidification ») en refroidissant le produit. Celui-ci est ensuite maintenu au froid pendant la suite du processus de fabrication et de conditionnement, et jusqu'à sa consommation.

Cependant, le refroidissement ne stoppe pas complètement la fermentation lactique ; même lorsque le produit est maintenu à 4°C, on observe une augmentation progressive de son acidité au cours du temps.

Ce phénomène, connu sous le nom de post-acidification, est responsable d'une dégradation des qualités organoleptiques du produit pendant sa conservation.

La post-acidification résulte essentiellement de l'utilisation par les bactéries, et principalement par *L. bulgaricus*, du lactose restant dans le produit à l'issue de l'étape d'acidification contrôlée. Pour l'éviter, il a été proposé d'utiliser des souches de *L. bulgaricus* ne fermentant pas, ou très peu, le lactose.

Une des enzymes essentielles pour la fermentation du lactose est la β -galactosidase, qui hydrolyse le lactose en glucose et galactose. Il a donc été proposé, pour obtenir des souches non-
5 postacidifiantes de *L. bulgaricus*, de produire des mutants artificiels, ou de sélectionner des mutants naturels, chez lesquels l'activité de cette enzyme était affectée.

Par exemple, le Brevet EP 402 450 au nom de
10 GENENCOR décrit l'obtention, par mutagénèse localisée du gène de la β -galactosidase, de mutants conditionnels de *L. bulgaricus*, chez lesquels la β -galactosidase qui est active lors de la fermentation à 40°C, perd son activité à la température ou au pH correspondant aux conditions de
15 conservation des produits laitiers fermentés.

La Demande JP 90053437 décrit l'obtention d'un mutant artificiel de *L. bulgaricus* ayant complètement perdu la capacité de fermenter le lactose, et la sélection d'un mutant naturel, à capacité réduite de
20 fermentation du lactose ; ces mutants sont néanmoins capables, l'un comme l'autre, de se développer et d'acidifier normalement en présence de *S. thermophilus*, à condition que le milieu soit supplémenté en glucose. Les sous-cultures de ces mutants conservent leurs
25 caractéristiques d'acidification, dans du lait dépourvu de glucose, après 10 repiquages.

Le Brevet EP 0518 096, au nom de la SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ, propose d'utiliser pour la fabrication de yoghourt, des mutants faiblement
30 postacidifiants de *Lactobacillus bulgaricus* préalablement sélectionnés sur le critère de la délétion d'un fragment du gène de la β -galactosidase. Le criblage et la caractérisation de ces mutants sont facilités, du fait que la présence de cette délétion peut être facilement
35 vérifiés sur des profils de restriction. En outre, les délétions sont connues pour être des mutations

irréversibles, ce qui permet d'obtenir facilement des souches mutantes stables à partir de la souche mère. Le Brevet EP 0518 096 décrit 2 types de mutants faiblement postacidifiants sélectionnés de la sorte. Les premiers
5 ont une délétion touchant uniquement le gène de la β -galactosidase ; lorsqu'ils sont associés à *S. thermophilus* et cultivés sur du lait, ils présentent, même en l'absence d'ajout de glucose, des propriétés de croissance et d'acidification comparables à celles de la
10 souche sauvage dont ils sont issus. Les seconds présentent une délétion plus importante, s'étendant sur au moins 1kb en aval du gène de la β -galactosidase ; lorsqu'ils sont associés à *S. thermophilus* ils croissent plus lentement et acidifient beaucoup moins que la souche
15 sauvage dont ils sont issus ; l'ajout de glucose au milieu de culture n'a que peu d'influence sur leurs propriétés d'acidification et de post-acidification.

Les mutants naturels chez lesquels la β -galactosidase est inactive sont beaucoup plus difficiles
20 à sélectionner et à maintenir en cultures pures dans le cas de mutations ponctuelles que dans le cas de mutants de délétion ; ceci s'explique par la probabilité plus faible qu'une mutation ponctuelle produise une protéine inactive, par la plus grande difficulté pour localiser et
25 caractériser les mutations ponctuelles par des profils de restriction, et par le taux de réversion très important.

La Demanderesse a maintenant trouvé d'autres mutants naturels de *L. bulgaricus*, ne portant pas de délétion dans le gène codant pour la β -galactosidase, et
30 présentant des caractéristiques technologiques avantageuses. Dans le cadre de la présente invention, un mutant non-sens, incapable d'assimiler le lactose, a été isolé à partir d'une culture d'un *L. bulgaricus* sauvage. Associé à *S. thermophilus*, en culture sur du lait, il
35 croît et acidifie beaucoup plus lentement que la souche sauvage dont il est issu. En revanche, sa croissance et

son acidification sont quasi-normales lorsque le lait est supplémenté en glucose.

La présente Invention a pour objet une souche mutante de *L. bulgaricus* dépourvue d'activité β -galactosidase, caractérisée en ce qu'elle porte une mutation introduisant un codon non-sens dans la séquence codant pour la β -galactosidase.

10 Une souche de *L. bulgaricus* conforme à l'invention a été déposée selon le Traité de Budapest le 14 janvier 1998, auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) tenue par l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, à Paris, sous le numéro I-1968.

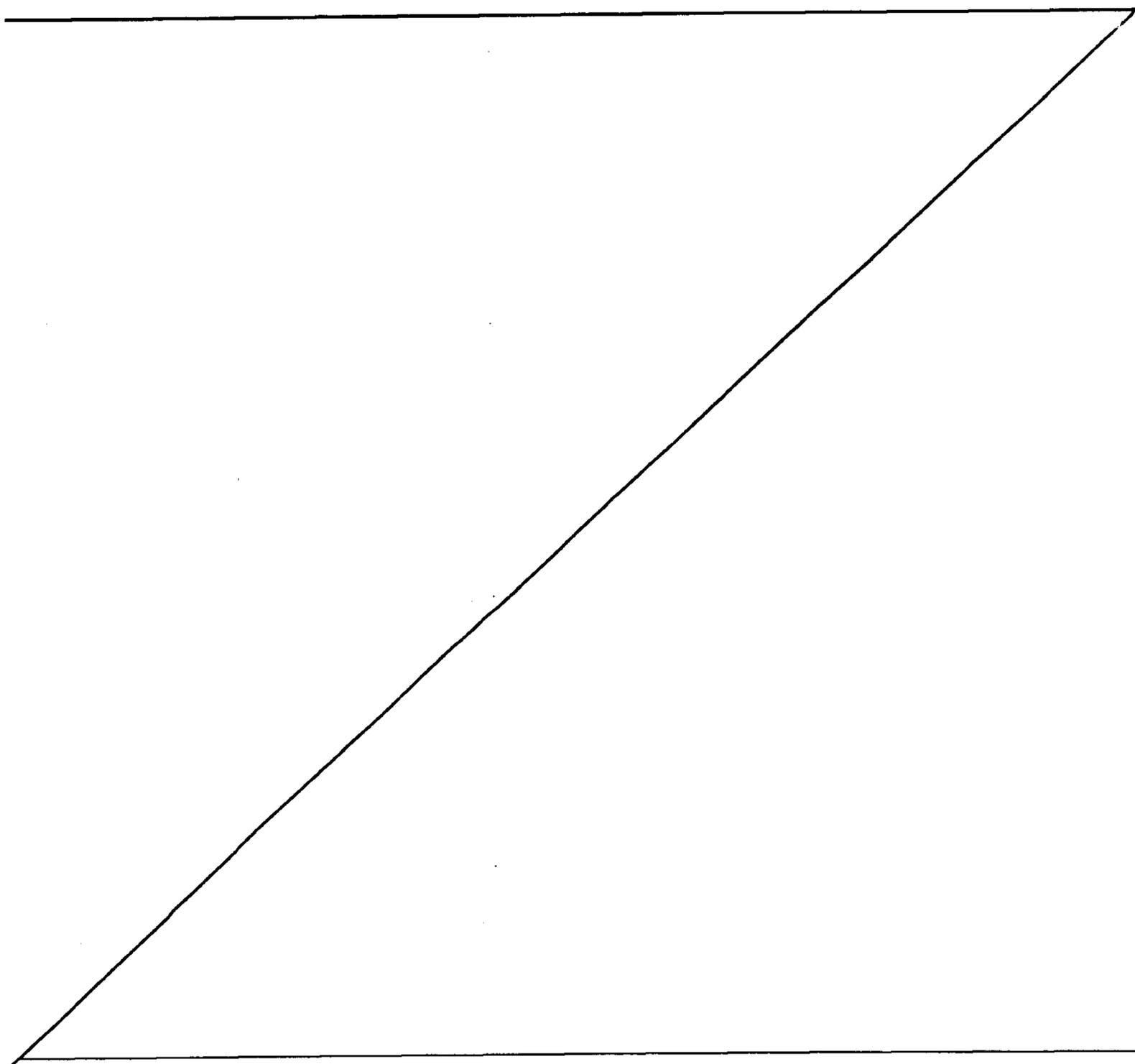
Cette souche présente les caractéristiques morphologiques et biochimiques suivantes :

- Morphologie : Microorganisme Gram-positif, bacilles fins, pléomorphes, asporogènes, isolés ou en courtes chaînes, immobiles.
- Métabolisme : homofermentaire, catalase (-).
- 20 - Fermentation des sucres : D-glucose (+), D-fructose (+), D-mannose (+), esculine (+).

Les Inventeurs ont séquencé l'opéron lactose chez le mutant I-1968. La séquence correspondante est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO:1. Les séquences des produits de traduction (perméase et β -galactosidase) sont respectivement représentées sous les numéros SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3

4a

L'analyse de cette séquence fait apparaître deux mutations ponctuelles : l'une, au niveau du gène de la perméase (position 122 de la séquence SEQ ID NO:1), induit un changement d'acide aminé (Lys → Asn) ; l'autre, au niveau du gène de la β -galactosidase (position 4519 de la séquence SEQ ID NO:1), introduit un codon de terminaison. Bien que conservant ses sites actifs



(positions 464 et 531), la β -galactosidase produite par ce mutant est inactive. Les Inventeurs ont en outre constaté que cette mutation restait stable après plusieurs séries de repiquages sur un milieu de culture contenant du glucose. En revanche, sur un milieu de culture en absence de glucose, cette mutation non-sens réverte très rapidement à un taux d'environ 10^{-6} .

La présente invention englobe également des souches mutantes incapables d'assimiler le lactose, dérivées de la souche I-1968. De telles souches peuvent par exemple être obtenues en induisant par mutagénèse dirigée, d'autres mutations dans l'opéron lactose de la souche I-1968.

La présente Invention a également pour objet un ferment lactique, en particulier un ferment du yoghourt, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une souche de *L. bulgaricus* conforme à l'Invention telle que définie ci-dessus, de préférence associée à au moins une souche de *S. thermophilus*.

Pour l'obtention d'un ferment conforme à l'invention, on peut utiliser n'importe quelle souche de *S. thermophilus* convenant pour la fabrication de yoghourt ; le choix d'une ou plusieurs souches de *S. thermophilus* peut être effectué en fonction des caractéristiques additionnelles que l'on souhaite éventuellement conférer au produit fini.

A titre d'exemple de souches de *S. thermophilus* pouvant être utilisées en association avec une souche de *L. bulgaricus* conforme à l'invention, on peut citer les souches suivantes, déposées auprès de la CNCM (Collection Nationale de Cultures de Microorganismes) tenue par l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, à Paris :

- la souche déposée le 25 août 1994, sous le numéro I-1470, et la souche déposée le 23 août 1995, sous

le numéro I-1620 ; ces 2 souches sont décrites dans la Demande Européenne publiée sous le numéro 96/06924 ;

- les souches déposées le 30 décembre 1994, sous les numéros I-1520 et I-1521 ; ces 2 souches sont
5 décrites dans la Demande Internationale PCT WO 96/20607 :

- la souche déposée le 24 octobre 1995 sous le numéro I-1630 ; les caractéristiques de cette souche sont décrites dans la Demande Internationale PCT WO 96/01701.

Ces souches peuvent être associées entre
10 elles, ou avec une ou plusieurs autres souches industrielles de *S. thermophilus*.

La ou les souche(s) de *S. thermophilus* sont associées avec la ou les souche(s) de *L. bulgaricus* conformes à l'invention de la même manière et dans les
15 mêmes proportions que dans les ferments du yoghourt traditionnels ; la population de bactéries *L. bulgaricus* conformes à l'invention peut par exemple représenter entre 10 et 90%, de préférence entre 20 et 50%, de la population bactérienne totale.

20 La présente Invention a également pour objet un procédé de préparation d'un produit laitier fermenté caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on fermente du lait à l'aide d'un ferment comprenant au moins une souche de *L. bulgaricus* conforme
25 à l'Invention, en présence d'au moins un sucre assimilable par ladite souche ; il peut s'agir notamment du fructose, du mannose, et de préférence, du glucose. Avantageusement ledit produit laitier fermenté est un yoghourt.

30 Le procédé conforme à l'Invention est similaire aux procédés traditionnels de préparation du yoghourt en ce qui concerne les principales modalités de mise en œuvre de l'étape d'acidification contrôlée ; en particulier cette acidification est effectuée à une
35 température comprise entre 20 et 45°C, et de préférence entre 30 et 45°C, et en « batch », c'est à dire en une

seule étape et en utilisant une seule cuve de fermentation.

La durée de cette étape d'acidification contrôlée est généralement de l'ordre de 6 à 24 heures, et de préférence de l'ordre de 6 à 16 heures ; elle est donc plus longue que dans le cas des procédés classiques de préparation de yoghourt (où elle est de 3 à 5 heures à 44°C). En effet, les souches de *L. bulgaricus* conformes à l'Invention, même associées à *S. thermophilus*, croissent et acidifient beaucoup plus lentement que les souches sauvages.

En outre, la vitesse de croissance et d'acidification des souches de *L. bulgaricus* conformes à l'invention varie très significativement en fonction de la quantité de glucose ajoutée au lait. Cette propriété permet de contrôler leur croissance et leur acidification, par simple addition de la quantité souhaitée de glucose en début de fermentation.

Les Inventeurs ont en outre observé que, lors de la mise en oeuvre de souches de *L. bulgaricus* ou de ferments conformes à l'Invention, l'acidification ralentit considérablement lorsque le pH atteint la zone de 4,8 à 4,5, (qui correspond à la zone de pH où l'on arrête l'acidification dans le cas d'un procédé traditionnel), et se stabilise, même si l'on maintient le lait à température de fermentation, à un pH plancher. La valeur de ce pH plancher dépend essentiellement de la quantité de glucose ajoutée.

Cette propriété permet de réduire, voire d'éliminer la phase de refroidissement utilisée dans les procédés traditionnels de fabrication du yoghourt pour stopper la fermentation. Elle supprime en outre la nécessité de mesurer le pH pour déterminer le moment optimal d'arrêt de la fermentation ; pour un ferment et une quantité de glucose ajoutés déterminés, il est possible, sans risque de sur-acidification, d'arrêter la

fermentation au bout d'une durée donnée, calculée en fonction du temps nécessaire pour atteindre le pH plancher. Ceci permet de mieux contrôler la régularité du pH final et la texture du produit en fin de fermentation.

5 Avantageusement, pour la mise en œuvre du procédé conforme à l'invention, et selon le degré d'acidification auquel on souhaite parvenir, la quantité de glucose ajoutée au lait préalablement à la fermentation est comprise entre 0,5 et 10 g/l, de
10 préférence entre 0,5 et 5 g/l.

 Le produit fermenté obtenu de la sorte peut être conservé plusieurs heures à une température proche de la température de fermentation, sans baisse du pH, ce qui permet de supprimer les installations de stockage
15 intermédiaire au froid et d'augmenter la capacité des cuves de fermentation.

 La mise en œuvre du procédé conforme à l'Invention permet de réduire la postacidification dans les produits fermentés au cours de leur conservation à
20 plus long terme. Le degré de postacidification peut varier selon la composition du ferment et la quantité de glucose utilisée. Cependant la postacidification est toujours nettement inférieure à celle observée dans le cas des yaourts obtenus avec les ferments et les procédés
25 traditionnels.

 Par exemple, des expérimentations effectuées par les Inventeurs ont montré que dans les mêmes conditions de conservation (28 jours de conservation à 10°C), le Δ pH (différence entre le pH à J0 et le pH à
30 J28) était compris entre 0,05 et 0,4 dans le cas des produits obtenus à l'aide d'un ferment conforme à l'invention, alors qu'il était toujours supérieur à 0,7 dans le cas de ferments témoins dans lesquels la souche de *L. bulgaricus* conforme à l'invention était remplacée
35 par une souche sauvage.

Cette faible post-acidification s'accompagne d'une bonne survie des souches du ferment ; la population de *L. bulgaricus* en fin de conservation, dans le produit fermenté obtenu conformément à l'invention n'est que
5 légèrement inférieure à celle du produit témoin.

La présente invention a également pour objet les produits laitiers fermentés susceptibles d'être obtenus en mettant en œuvre un procédé conforme à l'invention.

10 Ces produits peuvent se conserver pendant plus longtemps et à température plus élevées que les produits obtenus par les procédés traditionnels, et possèdent des caractéristiques organoleptiques qui restent stables au cours de la conservation.

15 **EXEMPLE 1 : DOSAGE BIOCHIMIQUE DE L'ACTIVITE BETA-GALACTOSIDASE D'UN MUTANT CONFORME A L'INVENTION.**

L'activité β -galactosidase de la souche I-1968 a été comparée à celle de la souche sauvage de *L. bulgaricus* (dénommée ci-après LbS) dont elle est
20 issue.

On cultive les bactéries pendant une nuit sur milieu MRS agar (MERCK) à 37°C, en jarre d'anaérobiose (MERCK) en présence d'un fixateur d'oxygène (AnaérocultA, MERCK).

25 Une öse de 10 microlitres (NUNC) de bactéries est resuspendue dans 1 millilitre d'eau stérile. Les bactéries sont lysées par 2 cycles d'agitation forte, 20 secondes à 5000 rotations par minute en présence de microbilles de verre (0,5 mm de diamètre, BIOSPEC
30 PRODUCTS), puis rajout de 0,15 ml de chloroforme. On agite l'ensemble pendant 30 minutes à 37°C, puis on complète à 2 ml avec de l'eau stérile à 4°C. L'activité bêta-galactosidase est alors mesurée : à partir de 0,2 ml de la suspension cellulaire on rajoute 1,2 ml de tampon
35 NaH_2PO_4 0,067M ; pH6,8 ; 0,05 ml de L-cystéine (SIGMA) à t0 0,05 ml de O-nitrophényl-bêta-D-galactopyranoside

(SIGMA). La réaction enzymatique est arrêtée après 0, 2, 5 ou 10 min. par 1 ml de tampon Na_2CO_3 10%, et on effectue une mesure de la DO à 400 nanomètres sur le surnageant, après centrifugation du milieu réactionnel.

5 Les activités galactosidase de la souche-mère LbS et du mutant I-1968 conforme à l'Invention mesurées en fonction du temps sont représentées sur la Figure 1. ✓

10 Ces résultats montrent que la β -galactosidase est totalement inactive chez le mutant conforme à l'Invention.

EXEMPLE 2 : STABILITÉ DU MUTANT I-1968 DE *L. BULGARICUS*

15 La stabilité du mutant I-1968 a été testée dans des milieux contenant comme sources de carbone soit un mélange de glucose et de lactose, soit du lactose seulement.

20 Une culture de I-1968 obtenue sur milieu MRS contenant du glucose est mise en sous-culture sur du lait stérilisé additionné d'autolysat de levure (2g/l), et supplémenté ou non avec du glucose (20g/l). Lorsqu'un pH de 5,2 (coagulation du lait) est atteint, on prélève des échantillons de chaque sous-culture, sur lesquels on analyse la capacité des bactéries à fermenter les sucres, ainsi que la présence d'activité β -galactosidase (test sur plaque X-gal : colonies blanches = β -galactosidase moins ; colonies bleues = β -galactosidase plus).

25 Les résultats sont illustrés par le Tableau I ci-dessous.

TABLEAU I

Milieu	Lait + glucose (20g/l)	Lait
Temps pour atteindre pH 5.2	6h00	20h00
Fermentation des sucres	glucose, fructose, mannose	lactose, glucose, fructose, mannose
Test sur plaque X- gal	100% Colonies blanches	20% colonies blanches 80% colonies bleues

Ces résultats montrent qu'en présence de glucose, la souche I-1968 ne réverte pas vers une souche capable d'utiliser le lactose. En revanche dans un milieu
5 contenant du lactose comme seule source de carbone, on observe une réversion rapide de la souche I-1968 vers l'état original.

**EXEMPLE 3 : PROPRIÉTÉS D'ACIDIFICATION, DE
POSTACIDIFICATION ET DE SURVIE DU VARIANT I-1968 DE
10 L. BULGARICUS EN SYMBIOSE AVEC S. THERMOPHILUS : CAS D'UN
PROCÉDÉ DE FABRICATION D'UN YOGHOURT FERME (FERMENTATION
EN ÉTUVE VENTILÉE)**

On prépare des ferments de yoghourt associant la souche I-1968 conforme à l'Invention avec différentes
15 souches industrielles de *S. thermophilus* (les souches de *S. thermophilus* utilisées sont dénommées ci-après ST1, ST2 et ST3).

A titre de comparaison, on prépare des ferments associant la souche-mère LbS, et les mêmes
20 souches de *S. thermophilus*.

Pour la préparation des ferments, les souches sontensemencées séparément à 1% sur la composition suivante :

Composition pour 1 litre :

25 135 g de poudre de lait écrémé
2 g d'autolysat de levure

920 ml d'eau distillée

20 g de glucose (pour la souche I-1968 uniquement)

Hydratation: 10 min

Pasteurisation: 30 min à 95°C

- 5 Le lait est ensuite refroidi à 44°C et inoculé, puis incubé à 44°C jusqu'à obtention d'une acidité de 85°D (degrés Dornic) pour les streptocoques et de 80°D pour les lactobacilles.

- 10 Les cultures sont ensuite réunies pour obtenir un ferment constitué à 80% de *Streptococcus thermophilus* et à 20% de *Lactobacillus bulgaricus*.

Les ferments ainsi obtenus sont utilisés pour inoculer la préparation suivante :

Composition pour 1 litre :

- 15 99% de lait

0, 1, ou 2 g/l de glucose

Hydratation: 10 min

Pasteurisation: 10 min à 95°C

- 20 Le lait est ensuite refroidi à 44°C et inoculé à 1%.

Pour chaque expérimentation, la composition du ferment et la quantité de glucose ajoutée sont indiquées dans le Tableau II ci-dessous :

TABLEAU II

Expérience	Glucose g/l	Souches	Pourcentage
1	0	ST 3 ST 2 LbS	64 % 16 % 20 %
2	0	ST 3 ST 2 I-1968	64 % 16 % 20 %
3	1	ST 3 ST 2 I-1968	64 % 16 % 20 %
4	0	ST 1 LbS	80 % 20 %
5	0	ST 1 I-1968	80 % 20 %
6	2	ST 1 I-1968	80 % 20 %

Après inoculation, le lait est réparti en ballons et incubé à une température de 44°C. Le profil d'acidification est suivi pendant l'incubation. Les produits sont décaillés à pH 4,6 par refroidissement en cellule froide (16 heures à 4°C).

Les produits sont ensuite soumis à un test de conservation à 10°C. Dans ce test, on mesure le pH et l'acidité Dornic après 1, 14, 21 et 28 jours de conservation.

Les résultats d'acidification (temps pour atteindre un pH de 4,6 et valeur du pH à 24h) sont présentés dans le tableau III ci-dessous :

TABLEAU III

Expérience	Temps pour atteindre pH 4,6 (min)	Temps pour atteindre pH 4,5 (min)	pH à 24h
1	215	236	3,67
2	550	778	4,33
3	416	507	4,26
4	225	241	3,67
5	660	>1500	4,54
6	390	465	4,35

Les résultats du test de conservation à 10°C (suivi du pH et de l'acidité Dornic), et de la survie

(populations de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*) à 28 jours sont présentés dans le tableau IV ci-dessous :

TABLEAU IV

Expérience	Temps de stockage (jours)	pH	Acidité Dornic	<i>Streptococcus thermophilus</i> cellules/ml	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> cellules/ml
1	1	4,41	101	7,25E+08	3,35E+08
1	14	3,98	140	ND	ND
1	21	3,95	145	ND	ND
1	28	3,9	148	7,35E+08	3,30E+08
2	1	4,5	93	5,60E+08	2,90E+07
2	14	4,23	110	ND	ND
2	21	4,18	112	ND	ND
2	28	4,19	114	5,65E+08	1,87E+07
3	1	4,49	96	6,90E+08	7,45E+07
3	14	4,14	115	ND	ND
3	21	4,15	117	ND	ND
3	28	4,15	120	8,65E+08	6,30E+07
4	1	4,39	105	6,30E+07	4,40E+08
4	14	3,91	145	ND	ND
4	21	3,9	151	ND	ND
4	28	3,85	157	4,70E+08	6,40E+08
5	1	4,6	85	9,05E+08	6,70E+07
5	14	4,58	80	ND	ND
5	21	4,53	80	ND	ND
5	28	4,61	79	9,40E+08	7,00E+07
6	1	4,51	89	1,05E+09	1,96E+08
6	14	4,38	90	ND	ND
6	21	4,39	96	ND	ND
6	28	4,42	90	1,62E+09	1,91E+08

ND : Non Déterminé

5 Ces résultats montrent que les yoghourts réalisés avec les symbioses associant la souche I-1968 à une ou deux souches de *S. thermophilus* présentent une postacidification extrêmement réduite par rapport aux mêmes symbioses avec la souche-mère LbS, tout en conservant une population abondante en fin de fermentation et une bonne survie pendant 28 jours à 10°C.

10 L'arrêt de l'acidification et le maintien du pH aux alentours de 4,6 à 4,5 pendant au moins 24 heures à 44°C permet dans le cadre de la fabrication de yoghourt brassé, de réduire, voire d'éliminer la phase de refroidissement en cuve qui est habituellement mise en œuvre.

15

WO 99/61627

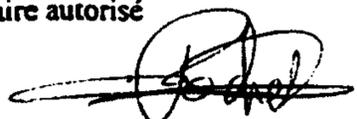
15

PCT/FR99/01165

INDICATIONS RELATIVES À UN MICRO-ORGANISME OU
AUTRE MATÉRIEL BIOLOGIQUE DÉPOSÉ

(règle 13bis du PCT)

A. Les indications ont trait au micro-organisme ou autre matériel biologique visé dans la description page <u>4</u> , ligne <u>9-22</u>	
B. IDENTIFICATION DU DÉPÔT D'autres dépôts font l'objet d'une feuille supplémentaire <input type="checkbox"/>	
Nom de l'institution de dépôt Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes	
Adresse de l'institution de dépôt (y compris le code postal et le pays) 28 rue du Docteur Roux, 75724 PARIS CEDEX 15, FRANCE	
Date du dépôt 14 janvier 1998	n° d'ordre I-1968
C. INDICATIONS SUPPLÉMENTAIRES (le cas échéant) Une feuille supplémentaire est jointe pour la suite de ces renseignements <input type="checkbox"/>	
"En ce qui concerne les désignations dans lesquelles un brevet européen est demandé, un échantillon du micro-organisme déposé ne sera accessible, jusqu'à la publication de la mention de délivrance du brevet européen ou jusqu'à la date à laquelle la demande sera rejetée, retirée ou réputée retirée, que par la remise d'un échantillon à un expert désigné par le requérant (règle 28.4 de la CBE)".	
D. ÉTATS DÉSIGNÉS POUR LESQUELS LES INDICATIONS SONT DONNÉES (si les indications ne sont pas données pour tous les États désignés)	
TOUS LES PAYS PARTIES AU PCT	
E. INDICATIONS FOURNIES SÉPARÉMENT (le cas échéant)	
Les indications énumérées ci-après seront fournies ultérieurement au Bureau international (spécifier la nature générale des indications p. ex., "n° d'ordre du dépôt")	

Réservé à l'office récepteur
<input checked="" type="checkbox"/> Cette feuille a été reçue en même temps que la demande internationale
Fonctionnaire autorisé 

Réservé au Bureau international
<input type="checkbox"/> Cette feuille est parvenue au Bureau international le :
Fonctionnaire autorisé

2329494.seq
LISTE DE SEQUENCES

<110> COMPAGNIE GERVAIS DANONE

<120> SOUCHES MUTANTES DE LACTOBACILLUS BULGARICUS DEPOURVUES
D'ACTIVITE BETA-GALACTOSIDASE

<130> 11186-0083

<140> 2.329.494
<141> 1999-05-17

<150> PCT/FR99/01165
<151> 1999-05-17

<150> FR9806456
<151> 1998-05-22

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 5059
<212> ADN
<213> Lactobacillus bulgaricus

<220>
<221> CDS
<222> (122)..(1873)

<220>
<221> CDS
<222> (1877)..(4519)

<400> 1
gcttgtctca cgcttgctcgt acgcggccgg tgcctttggc aacgacgtct tctacgcgac 60
tctgtcaacc tactttatcg tcttcgctcacc caccacctc tttaatgccg gtgaccacaa 120
g atg atc ttt atc atc acc aac ttg atc acc gcc atc cgg atc ggg gaa 169
Met Ile Phe Ile Ile Thr Asn Leu Ile Thr Ala Ile Arg Ile Gly Glu
1 5 10 15
gtc ctg ctc gac ccc ttg atc ggt aac gcc atc gac cgg acc gaa agc 217
Val Leu Leu Asp Pro Leu Ile Gly Asn Ala Ile Asp Arg Thr Glu Ser
20 25 30
cgg tgg ggg aag ttc aag ccc tgg gtt gtg ggc ggg ggg atc atc agc 265
Arg Trp Gly Lys Phe Lys Pro Trp Val Val Gly Gly Gly Ile Ile Ser
35 40 45
tca tta gcc ctc tta gcc ctc ttt acc gac ttt ggc ggc att aac caa 313
Ser Leu Ala Leu Leu Ala Leu Phe Thr Asp Phe Gly Gly Ile Asn Gln
50 55 60

2329494.seq

agc	aac	ccc	gtt	gtt	tac	tta	gta	atc	ttc	ggt	att	gtt	tac	ttg	att	361
Ser	Asn	Pro	Val	Val	Tyr	Leu	Val	Ile	Phe	Gly	Ile	Val	Tyr	Leu	Ile	
65					70					75					80	
atg	gat	atc	ttc	tac	tca	ttt	aaa	gac	act	ggc	ttc	tgg	gcc	atg	atc	409
Met	Asp	Ile	Phe	Tyr	Ser	Phe	Lys	Asp	Thr	Gly	Phe	Trp	Ala	Met	Ile	
				85					90					95		
ccg	gcc	ttg	tcc	ctg	gat	tcc	cgg	gaa	aga	gag	aag	acc	tcc	acc	ttc	457
Pro	Ala	Leu	Ser	Leu	Asp	Ser	Arg	Glu	Arg	Glu	Lys	Thr	Ser	Thr	Phe	
			100					105					110			
gcc	aga	gtc	ggc	tcc	acc	atc	ggg	gcc	aac	ctg	gtc	ggg	gta	gtc	atc	505
Ala	Arg	Val	Gly	Ser	Thr	Ile	Gly	Ala	Asn	Leu	Val	Gly	Val	Val	Ile	
		115					120					125				
acc	cca	atc	atc	ctc	ttc	ttc	tcg	gcc	agc	aag	gcc	aac	ccc	aac	ggg	553
Thr	Pro	Ile	Ile	Leu	Phe	Phe	Ser	Ala	Ser	Lys	Ala	Asn	Pro	Asn	Gly	
	130					135					140					
gat	aag	cag	ggc	tgg	ttc	ttc	ttt	gcc	ttg	atc	gtg	gcc	att	gtc	ggc	601
Asp	Lys	Gln	Gly	Trp	Phe	Phe	Phe	Ala	Leu	Ile	Val	Ala	Ile	Val	Gly	
145					150					155					160	
atc	ttg	acc	tca	att	acc	gtt	ggt	ctt	ggt	act	cac	gaa	gta	aaa	tcc	649
Ile	Leu	Thr	Ser	Ile	Thr	Val	Gly	Leu	Gly	Thr	His	Glu	Val	Lys	Ser	
				165					170					175		
gcc	ctg	cgg	gaa	agc	aat	gaa	aag	acc	act	ttg	aag	cag	gtc	ttt	aag	697
Ala	Leu	Arg	Glu	Ser	Asn	Glu	Lys	Thr	Thr	Leu	Lys	Gln	Val	Phe	Lys	
			180					185					190			
gtc	ctg	ggg	caa	aac	gac	cag	ctc	ctc	tgg	ctg	gcc	ttt	gcc	tac	tgg	745
Val	Leu	Gly	Gln	Asn	Asp	Gln	Leu	Leu	Trp	Leu	Ala	Phe	Ala	Tyr	Trp	
		195					200					205				
ttt	tac	ggc	ctg	ggt	atc	aac	acc	ctg	aac	gct	ctg	caa	ctt	tac	tac	793
Phe	Tyr	Gly	Leu	Gly	Ile	Asn	Thr	Leu	Asn	Ala	Leu	Gln	Leu	Tyr	Tyr	
	210					215				220						
ttc	tca	tac	atc	tta	ggc	gat	gcc	cgc	ggc	tac	agc	ctg	ctt	tac	acc	841
Phe	Ser	Tyr	Ile	Leu	Gly	Asp	Ala	Arg	Gly	Tyr	Ser	Leu	Leu	Tyr	Thr	
225					230					235					240	
atc	aac	acc	ttt	gtc	ggt	tta	atc	tct	gca	tcc	ttc	ttc	cca	tca	ctg	889
Ile	Asn	Thr	Phe	Val	Gly	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser	Phe	Phe	Pro	Ser	Leu	
				245					250					255		
gcc	aag	aag	ttc	aac	aga	aat	cgc	ctc	ttc	tac	gcc	tgc	atc	gcg	gtg	937
Ala	Lys	Lys	Phe	Asn	Arg	Asn	Arg	Leu	Phe	Tyr	Ala	Cys	Ile	Ala	Val	
			260					265					270			
atg	ctg	tta	ggg	atc	ggg	gtc	ttc	tcc	gtg	gcc	agc	ggt	tct	ctg	gcc	985
Met	Leu	Leu	Gly	Ile	Gly	Val	Phe	Ser	Val	Ala	Ser	Gly	Ser	Leu	Ala	

2329494.seq

275		280		285		
ctg tcc ctt gtt ggg gca gaa ttc ttc ttt att ccg cag cct ctg gcc						1033
Leu Ser Leu Val Gly Ala Glu Phe Phe Phe Ile Pro Gln Pro Leu Ala						
290		295		300		
ttc ctg gtc gtt ttg atg atc atc tct gac gct gtt gaa tac ggc cag						1081
Phe Leu Val Val Leu Met Ile Ile Ser Asp Ala Val Glu Tyr Gly Gln						
305		310		315		320
ctg aaa act ggc cac aga gac gaa gct ttg acc ctg tct gtc cgg cca						1129
Leu Lys Thr Gly His Arg Asp Glu Ala Leu Thr Leu Ser Val Arg Pro						
		325		330		335
ttg gtc gat aag ctg ggc ggg gcc ttg tcc aac tgg ttt gtt tcc ttg						1177
Leu Val Asp Lys Leu Gly Gly Ala Leu Ser Asn Trp Phe Val Ser Leu						
		340		345		350
att gcc tta act gcc ggc atg acc act ggg gcg act gcc tca aca att						1225
Ile Ala Leu Thr Ala Gly Met Thr Thr Gly Ala Thr Ala Ser Thr Ile						
		355		360		365
aca gct cat ggc cag atg gtc ttc aag tta gct atg ttt gcc tta ccg						1273
Thr Ala His Gly Gln Met Val Phe Lys Leu Ala Met Phe Ala Leu Pro						
		370		375		380
gca gtc atg ctc ttg atc gct gtt tct att ttc gcc aaa aag gtc ttc						1321
Ala Val Met Leu Leu Ile Ala Val Ser Ile Phe Ala Lys Lys Val Phe						
		385		390		395
ttg act gaa gaa aag cac gcg gaa atc gtc gac cag ctg gaa act caa						1369
Leu Thr Glu Glu Lys His Ala Glu Ile Val Asp Gln Leu Glu Thr Gln						
		405		410		415
ttc agc caa agc cat gcc caa aag ccg gcg caa gct gaa agc ttc act						1417
Phe Ser Gln Ser His Ala Gln Lys Pro Ala Gln Ala Glu Ser Phe Thr						
		420		425		430
ttg gcc agc cca gtc tcc gga caa tta atg aac ctg gac atg gtt gac						1465
Leu Ala Ser Pro Val Ser Gly Gln Leu Met Asn Leu Asp Met Val Asp						
		435		440		445
gac ccg gtc ttt gcc gac aaa aag tta ggc gac ggc ttt gcc ctg gtg						1513
Asp Pro Val Phe Ala Asp Lys Lys Leu Gly Asp Gly Phe Ala Leu Val						
		450		455		460
cca gca gac ggt aag gtc tac gcg cca ttt gcc ggt act gtc cgc cag						1561
Pro Ala Asp Gly Lys Val Tyr Ala Pro Phe Ala Gly Thr Val Arg Gln						
		465		470		475
ctg gcc aag acc cgg cac tcg atc gtc ctg gaa aat gaa cat ggg gtc						1609
Leu Ala Lys Thr Arg His Ser Ile Val Leu Glu Asn Glu His Gly Val						
		485		490		495
ttg gtc ttg att cac ctt ggc ctg ggc acg gtc aaa tta aac ggg act						1657

2329494.seq

Leu	Val	Leu	Ile	His	Leu	Gly	Leu	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Asn	Gly	Thr		
			500					505					510				
ggc	ttt	gtc	agc	tat	gtt	gaa	gag	ggc	agc	cag	gta	gaa	gcc	ggc	cag		1705
Gly	Phe	Val	Ser	Tyr	Val	Glu	Glu	Gly	Ser	Gln	Val	Glu	Ala	Gly	Gln		
		515					520					525					
cag	atc	ctg	gaa	ttc	tgg	gac	ccg	gcg	atc	aag	cag	gcc	aag	ctg	gac		1753
Gln	Ile	Leu	Glu	Phe	Trp	Asp	Pro	Ala	Ile	Lys	Gln	Ala	Lys	Leu	Asp		
	530					535					540						
gac	acg	gta	atc	gtg	acc	gtc	atc	aac	agc	gaa	act	ttc	gca	aat	agc		1801
Asp	Thr	Val	Ile	Val	Thr	Val	Ile	Asn	Ser	Glu	Thr	Phe	Ala	Asn	Ser		
545					550					555					560		
cag	atg	ctc	ttg	ccg	atc	ggc	cac	agc	gtc	caa	gcc	ctg	gat	gat	gta		1849
Gln	Met	Leu	Leu	Pro	Ile	Gly	His	Ser	Val	Gln	Ala	Leu	Asp	Asp	Val		
				565					570					575			
ttc	aag	tta	gaa	ggg	aag	aat	tag	aaa	atg	agc	aat	aag	tta	gta	aaa		1897
Phe	Lys	Leu	Glu	Gly	Lys	Asn			Met	Ser	Asn	Lys	Leu	Val	Lys		
			580						585					590			
gaa	aaa	aga	gtt	gac	cag	gca	gac	ttg	gcc	tgg	ctg	act	gac	ccg	gaa		1945
Glu	Lys	Arg	Val	Asp	Gln	Ala	Asp	Leu	Ala	Trp	Leu	Thr	Asp	Pro	Glu		
			595					600					605				
gtt	tac	gaa	gtc	aat	aca	att	ccc	ccg	cac	tcc	gac	cat	gag	tcc	ttc		1993
Val	Tyr	Glu	Val	Asn	Thr	Ile	Pro	Pro	His	Ser	Asp	His	Glu	Ser	Phe		
		610					615					620					
caa	agc	cag	gaa	gaa	ctg	gag	gag	ggc	aag	tcc	agt	tta	gtg	cag	tcc		2041
Gln	Ser	Gln	Glu	Glu	Leu	Glu	Glu	Gly	Lys	Ser	Ser	Leu	Val	Gln	Ser		
	625					630					635						
ctg	gac	ggg	gac	tgg	ctg	att	gac	tac	gct	gaa	aac	ggc	cag	gga	cca		2089
Leu	Asp	Gly	Asp	Trp	Leu	Ile	Asp	Tyr	Ala	Glu	Asn	Gly	Gln	Gly	Pro		
640					645					650					655		
gtc	aac	ttc	tat	gca	gaa	gac	ttt	gac	gat	agc	aat	ttt	aag	tca	gtc		2137
Val	Asn	Phe	Tyr	Ala	Glu	Asp	Phe	Asp	Asp	Ser	Asn	Phe	Lys	Ser	Val		
				660					665					670			
aaa	gta	ccc	ggc	aac	ctg	gaa	ctg	caa	ggc	ttt	ggc	cag	ccc	cag	tat		2185
Lys	Val	Pro	Gly	Asn	Leu	Glu	Leu	Gln	Gly	Phe	Gly	Gln	Pro	Gln	Tyr		
			675					680					685				
gtc	aac	gtc	caa	tat	cca	tgg	gac	ggc	agt	gag	gag	att	ttc	ccg	ccc		2233
Val	Asn	Val	Gln	Tyr	Pro	Trp	Asp	Gly	Ser	Glu	Glu	Ile	Phe	Pro	Pro		
		690					695					700					
caa	att	cca	agc	aaa	aat	ccg	ctc	gct	tct	tat	gtc	aga	tac	ttt	gac		2281
Gln	Ile	Pro	Ser	Lys	Asn	Pro	Leu	Ala	Ser	Tyr	Val	Arg	Tyr	Phe	Asp		
	705					710					715						

2329494.seq

ctg	gat	gaa	gct	ttc	tgg	gac	aag	gaa	gtc	agc	ttg	aag	ttt	gac	ggg	2329
Leu	Asp	Glu	Ala	Phe	Trp	Asp	Lys	Glu	Val	Ser	Leu	Lys	Phe	Asp	Gly	
720					725					730					735	
gcg	gca	aca	gcc	atc	tat	gtc	tgg	ctg	aac	ggc	cac	ttc	gtc	ggc	tac	2377
Ala	Ala	Thr	Ala	Ile	Tyr	Val	Trp	Leu	Asn	Gly	His	Phe	Val	Gly	Tyr	
				740					745					750		
ggg	gaa	gac	tcc	ttt	acc	cca	agc	gag	ttt	atg	gtt	acc	aag	ttc	ctc	2425
Gly	Glu	Asp	Ser	Phe	Thr	Pro	Ser	Glu	Phe	Met	Val	Thr	Lys	Phe	Leu	
			755					760					765			
aag	aaa	gaa	aat	aac	cgc	ctg	gca	gtg	gct	ctc	tac	aag	tat	tct	tcc	2473
Lys	Lys	Glu	Asn	Asn	Arg	Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Tyr	Lys	Tyr	Ser	Ser	
		770					775					780				
gcc	tcc	tgg	ctg	gaa	gac	cag	gac	ttc	tgg	cgc	atg	tct	ggg	ttg	ttc	2521
Ala	Ser	Trp	Leu	Glu	Asp	Gln	Asp	Phe	Trp	Arg	Met	Ser	Gly	Leu	Phe	
	785					790					795					
aga	tca	gtg	act	ctt	cag	gcc	aag	ccg	cgt	ctg	cac	ttg	gag	gac	ctt	2569
Arg	Ser	Val	Thr	Leu	Gln	Ala	Lys	Pro	Arg	Leu	His	Leu	Glu	Asp	Leu	
800					805					810					815	
aag	ctt	acg	gcc	agc	ttg	acc	gat	aac	tac	caa	aaa	gga	aag	ctg	gaa	2617
Lys	Leu	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Asp	Asn	Tyr	Gln	Lys	Gly	Lys	Leu	Glu	
				820					825					830		
gtc	gaa	gcc	aat	att	gcc	tac	cgc	ttg	cca	aat	gcc	agc	ttt	aag	ctg	2665
Val	Glu	Ala	Asn	Ile	Ala	Tyr	Arg	Leu	Pro	Asn	Ala	Ser	Phe	Lys	Leu	
			835					840					845			
gaa	gtg	cgg	gat	agt	gaa	ggt	gac	ttg	gtt	gct	gaa	aag	ctg	ggc	cca	2713
Glu	Val	Arg	Asp	Ser	Glu	Gly	Asp	Leu	Val	Ala	Glu	Lys	Leu	Gly	Pro	
		850					855					860				
atc	aga	agc	gag	cag	ctg	gaa	ttc	act	ctg	gct	gat	ttg	cca	gta	gct	2761
Ile	Arg	Ser	Glu	Gln	Leu	Glu	Phe	Thr	Leu	Ala	Asp	Leu	Pro	Val	Ala	
	865					870					875					
gcc	tgg	agc	gcg	gaa	aag	cct	aac	ctt	tac	cag	gtc	cgc	ctg	tat	tta	2809
Ala	Trp	Ser	Ala	Glu	Lys	Pro	Asn	Leu	Tyr	Gln	Val	Arg	Leu	Tyr	Leu	
880					885					890					895	
tac	cag	gca	ggc	agc	ctc	tta	gag	gtt	agc	cgg	cag	gaa	gtg	ggg	ttc	2857
Tyr	Gln	Ala	Gly	Ser	Leu	Leu	Glu	Val	Ser	Arg	Gln	Glu	Val	Gly	Phe	
				900					905					910		
cgc	aac	ttt	gaa	cta	aaa	gac	ggg	att	atg	tac	ctt	aac	ggc	cag	cgg	2905
Arg	Asn	Phe	Glu	Leu	Lys	Asp	Gly	Ile	Met	Tyr	Leu	Asn	Gly	Gln	Arg	
			915					920					925			
atc	gtc	ttc	aag	ggg	gcc	aac	cgg	cac	gaa	ttt	gac	agt	aag	ttg	ggc	2953
Ile	Val	Phe	Lys	Gly	Ala	Asn	Arg	His	Glu	Phe	Asp	Ser	Lys	Leu	Gly	
		930					935					940				

2329494.seq

cgg gct atc aca gaa gag gat atg atc tgg gat atc aag acc atg aag 3001
 Arg Ala Ile Thr Glu Glu Asp Met Ile Trp Asp Ile Lys Thr Met Lys
 945 950 955

cga agc aac atc aat gct gtc cgc tgc tct cac tac ccg aac cag tcc 3049
 Arg Ser Asn Ile Asn Ala Val Arg Cys Ser His Tyr Pro Asn Gln Ser
 960 965 970 975

ctc ttt tac cgg ctc tgt gac aag tac ggc ctt tac gtc att gat gaa 3097
 Leu Phe Tyr Arg Leu Cys Asp Lys Tyr Gly Leu Tyr Val Ile Asp Glu
 980 985 990

gct aac ctg gaa agc cac ggc acc tgg gaa aaa gtg ggg ggg cac gaa 3145
 Ala Asn Leu Glu Ser His Gly Thr Trp Glu Lys Val Gly Gly His Glu
 995 1000 1005

gat cct agc ttc aat gtt cca ggc gat gac cag cat tgg ctg gga gcc 3193
 Asp Pro Ser Phe Asn Val Pro Gly Asp Asp Gln His Trp Leu Gly Ala
 1010 1015 1020

agc tta tcc cgg gtg aag aac atg atg gct cgg gac aag aac cat gct 3241
 Ser Leu Ser Arg Val Lys Asn Met Met Ala Arg Asp Lys Asn His Ala
 1025 1030 1035

tca atc ctg atc tgg tct tta ggc aat gag tct tac gcc ggc act gtc 3289
 Ser Ile Leu Ile Trp Ser Leu Gly Asn Glu Ser Tyr Ala Gly Thr Val
 1040 1045 1050 1055

ttt gcc caa atg gct gat tac gtc cgg aag gct gat ccg acc cgg gtt 3337
 Phe Ala Gln Met Ala Asp Tyr Val Arg Lys Ala Asp Pro Thr Arg Val
 1060 1065 1070

cag cac tat gaa ggg gtg acc cac aac cgg aag ttt gac gac gcc acc 3385
 Gln His Tyr Glu Gly Val Thr His Asn Arg Lys Phe Asp Asp Ala Thr
 1075 1080 1085

cag att gaa agc cgg atg tat gct ccg gcc aag gta att gaa gaa tac 3433
 Gln Ile Glu Ser Arg Met Tyr Ala Pro Ala Lys Val Ile Glu Glu Tyr
 1090 1095 1100

ttg acc aat aaa cca gcc aag cca ttt atc tca gtt gaa tac gct cac 3481
 Leu Thr Asn Lys Pro Ala Lys Pro Phe Ile Ser Val Glu Tyr Ala His
 1105 1110 1115

gcc atg ggc aac tcc gtc ggt gac ctg gcc gcc tac acg gcc ctg gaa 3529
 Ala Met Gly Asn Ser Val Gly Asp Leu Ala Ala Tyr Thr Ala Leu Glu
 1120 1125 1130 1135

aaa tac ccc cac tac cag ggc ggc ttc atc tgg gac tgg att gac caa 3577
 Lys Tyr Pro His Tyr Gln Gly Gly Phe Ile Trp Asp Trp Ile Asp Gln
 1140 1145 1150

gga ctg gaa aaa gac ggg cac ctg ctt tat ggg ggc gac ttc gat gac 3625
 Gly Leu Glu Lys Asp Gly His Leu Leu Tyr Gly Gly Asp Phe Asp Asp

2329494.seq

1155	1160	1165	
cgg cca acc gac tat gaa ttc tgc ggg aac ggc ctg gtc ttt gct gac			3673
Arg Pro Thr Asp Tyr Glu Phe Cys Gly Asn Gly Leu Val Phe Ala Asp			
1170	1175	1180	
cgg act gaa tcg ccg aaa ctg gct aat gtc aag gcc ctt tac gcc aac			3721
Arg Thr Glu Ser Pro Lys Leu Ala Asn Val Lys Ala Leu Tyr Ala Asn			
1185	1190	1195	
ctt aag tta gaa gta aaa gat ggg cag ctc ttc ctc aaa aac gac aat			3769
Leu Lys Leu Glu Val Lys Asp Gly Gln Leu Phe Leu Lys Asn Asp Asn			
1200	1205	1210	1215
tta ttt acc aac agc tca tct tac tac ttc ttg act agt ctt ttg gtc			3817
Leu Phe Thr Asn Ser Ser Ser Tyr Tyr Phe Leu Thr Ser Leu Leu Val			
1220	1225	1230	
gat ggc aag ttg acc tac cag agc cgg cct ctg acc ttt ggc ctg gag			3865
Asp Gly Lys Leu Thr Tyr Gln Ser Arg Pro Leu Thr Phe Gly Leu Glu			
1235	1240	1245	
cct ggc gaa tcc ggg acc ttt gcc ctg cct tgg ccg gaa gtc gct gat			3913
Pro Gly Glu Ser Gly Thr Phe Ala Leu Pro Trp Pro Glu Val Ala Asp			
1250	1255	1260	
gaa aaa gga gag gtc gtc tac cgg gta acg gcc cac tta aaa gaa gac			3961
Glu Lys Gly Glu Val Val Tyr Arg Val Thr Ala His Leu Lys Glu Asp			
1265	1270	1275	
ttg cct tgg gcg gat gag ggc ttc act gtg gct gaa gca gaa gaa gta			4009
Leu Pro Trp Ala Asp Glu Gly Phe Thr Val Ala Glu Ala Glu Glu Val			
1280	1285	1290	1295
gct caa aag ctg ccg gaa ttt aag ccg gaa ggg ccg cca gat tta gtt			4057
Ala Gln Lys Leu Pro Glu Phe Lys Pro Glu Gly Arg Pro Asp Leu Val			
1300	1305	1310	
gat tcc gac tac aac cta ggc ctg aaa gga aat aac ttc caa att ctc			4105
Asp Ser Asp Tyr Asn Leu Gly Leu Lys Gly Asn Asn Phe Gln Ile Leu			
1315	1320	1325	
ttc tcc aag gtc aag ggc tgg ccg gtt tcc ctc aag tat gcc ggt agg			4153
Phe Ser Lys Val Lys Gly Trp Pro Val Ser Leu Lys Tyr Ala Gly Arg			
1330	1335	1340	
gaa tac ttg aag cgg ctg ccg gaa ttt acc ttc tgg ccg gcc ctg acg			4201
Glu Tyr Leu Lys Arg Leu Pro Glu Phe Thr Phe Trp Arg Ala Leu Thr			
1345	1350	1355	
gac aac gac ccg gga gct ggt tac ggc tat gat ctg gcc ccg tgg gaa			4249
Asp Asn Asp Arg Gly Ala Gly Tyr Gly Tyr Asp Leu Ala Arg Trp Glu			
1360	1365	1370	1375
aat gcc ggc aag tat gcc cgc ttg aaa gac atc agc tgc gag gtc aag			4297

2329494.seq

Asn Ala Gly Lys Tyr Ala Arg Leu Lys Asp Ile Ser Cys Glu Val Lys
1380 1385 1390

gaa gac tcc gtt ttg gtc aag act gcc ttt acg ttg cct gtc gcc tta 4345
Glu Asp Ser Val Leu Val Lys Thr Ala Phe Thr Leu Pro Val Ala Leu
1395 1400 1405

aag ggt gat tta act gtg acc tat gaa gtc gat gga cgg ggc aag att 4393
Lys Gly Asp Leu Thr Val Thr Tyr Glu Val Asp Gly Arg Gly Lys Ile
1410 1415 1420

gct gta aca gct gac ttc cca ggc gcg gaa gaa gcc ggt ctc ttg cca 4441
Ala Val Thr Ala Asp Phe Pro Gly Ala Glu Glu Ala Gly Leu Leu Pro
1425 1430 1435

gcc ttt ggc ttg aac ctg gcc ctg cca aaa gaa ctg acc gat tac cgc 4489
Ala Phe Gly Leu Asn Leu Ala Leu Pro Lys Glu Leu Thr Asp Tyr Arg
1440 1445 1450 1455

tac tat ggt ctg gga cct aat gag agc taa ccagaccgct tggaaggtaa 4539
Tyr Tyr Gly Leu Gly Pro Asn Glu Ser
1460 1465

ttacctgggc atctaccagg gagcggtaaa aaagaacttt agcccatacc tgcgtccgca 4599

ggaaacgggc aaccggagca aggttcgctg gtaccagctc tttgatgaaa agggcggcctt 4659

ggaatttacg gccaatgggg cagacttgaa cttgtctgct ttgccatatt ctgccgcca 4719

aattgaagca gcggaccacg cttttgaact gactaacaat tacacttggg ttagagcctt 4779

aagcgcaccag atggggggtcg gcgggggatga ctccctggggg cagaagggtcc acccggaatt 4839

ctgcctggat gctcaaaaag cccgccagct ccgcctgggtg attcagcccc ttttactaaa 4899

ataaatgcta caattgactt aacaggatga aattttagta aaagcaaagc gagtgaggaa 4959

gatggcaacg atcagagaag tgccaaggca gccggcgtgt cgctagcgcac ggtttcccgc 5019

gtccttgaact atgaccagac cctgtcagtc aatgaggcaa 5059

<210> 2

<211> 583

<212> PRT

<213> Lactobacillus bulgaricus

<400> 2

Met Ile Phe Ile Ile Thr Asn Leu Ile Thr Ala Ile Arg Ile Gly Glu
1 5 10 15

Val Leu Leu Asp Pro Leu Ile Gly Asn Ala Ile Asp Arg Thr Glu Ser
20 25 30

Arg Trp Gly Lys Phe Lys Pro Trp Val Val Gly Gly Gly Ile Ile Ser
35 40 45

2329494.seq

Ser Leu Ala Leu Leu Ala Leu Phe Thr Asp Phe Gly Gly Ile Asn Gln
 50 55 60
 Ser Asn Pro Val Val Tyr Leu Val Ile Phe Gly Ile Val Tyr Leu Ile
 65 70 75 80
 Met Asp Ile Phe Tyr Ser Phe Lys Asp Thr Gly Phe Trp Ala Met Ile
 85 90 95
 Pro Ala Leu Ser Leu Asp Ser Arg Glu Arg Glu Lys Thr Ser Thr Phe
 100 105 110
 Ala Arg Val Gly Ser Thr Ile Gly Ala Asn Leu Val Gly Val Val Ile
 115 120 125
 Thr Pro Ile Ile Leu Phe Phe Ser Ala Ser Lys Ala Asn Pro Asn Gly
 130 135 140
 Asp Lys Gln Gly Trp Phe Phe Phe Ala Leu Ile Val Ala Ile Val Gly
 145 150 155 160
 Ile Leu Thr Ser Ile Thr Val Gly Leu Gly Thr His Glu Val Lys Ser
 165 170 175
 Ala Leu Arg Glu Ser Asn Glu Lys Thr Thr Leu Lys Gln Val Phe Lys
 180 185 190
 Val Leu Gly Gln Asn Asp Gln Leu Leu Trp Leu Ala Phe Ala Tyr Trp
 195 200 205
 Phe Tyr Gly Leu Gly Ile Asn Thr Leu Asn Ala Leu Gln Leu Tyr Tyr
 210 215 220
 Phe Ser Tyr Ile Leu Gly Asp Ala Arg Gly Tyr Ser Leu Leu Tyr Thr
 225 230 235 240
 Ile Asn Thr Phe Val Gly Leu Ile Ser Ala Ser Phe Phe Pro Ser Leu
 245 250 255
 Ala Lys Lys Phe Asn Arg Asn Arg Leu Phe Tyr Ala Cys Ile Ala Val
 260 265 270
 Met Leu Leu Gly Ile Gly Val Phe Ser Val Ala Ser Gly Ser Leu Ala
 275 280 285
 Leu Ser Leu Val Gly Ala Glu Phe Phe Phe Ile Pro Gln Pro Leu Ala
 290 295 300
 Phe Leu Val Val Leu Met Ile Ile Ser Asp Ala Val Glu Tyr Gly Gln
 305 310 315 320
 Leu Lys Thr Gly His Arg Asp Glu Ala Leu Thr Leu Ser Val Arg Pro
 325 330 335
 Leu Val Asp Lys Leu Gly Gly Ala Leu Ser Asn Trp Phe Val Ser Leu

2329494.seq

Val	Lys	Ala	Leu	Tyr	Ala	Asn	Leu	Lys	Leu	Glu	Val	Lys	Asp	Gly	Gln
610						615					620				
Leu	Phe	Leu	Lys	Asn	Asp	Asn	Leu	Phe	Thr	Asn	Ser	Ser	Ser	Tyr	Tyr
625					630					635					640
Phe	Leu	Thr	Ser	Leu	Leu	Val	Asp	Gly	Lys	Leu	Thr	Tyr	Gln	Ser	Arg
				645					650					655	
Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Glu	Ser	Gly	Thr	Phe	Ala	Leu
			660					665					670		
Pro	Trp	Pro	Glu	Val	Ala	Asp	Glu	Lys	Gly	Glu	Val	Val	Tyr	Arg	Val
		675					680					685			
Thr	Ala	His	Leu	Lys	Glu	Asp	Leu	Pro	Trp	Ala	Asp	Glu	Gly	Phe	Thr
	690					695					700				
Val	Ala	Glu	Ala	Glu	Glu	Val	Ala	Gln	Lys	Leu	Pro	Glu	Phe	Lys	Pro
705					710					715					720
Glu	Gly	Arg	Pro	Asp	Leu	Val	Asp	Ser	Asp	Tyr	Asn	Leu	Gly	Leu	Lys
				725					730					735	
Gly	Asn	Asn	Phe	Gln	Ile	Leu	Phe	Ser	Lys	Val	Lys	Gly	Trp	Pro	Val
			740					745					750		
Ser	Leu	Lys	Tyr	Ala	Gly	Arg	Glu	Tyr	Leu	Lys	Arg	Leu	Pro	Glu	Phe
		755					760					765			
Thr	Phe	Trp	Arg	Ala	Leu	Thr	Asp	Asn	Asp	Arg	Gly	Ala	Gly	Tyr	Gly
	770					775					780				
Tyr	Asp	Leu	Ala	Arg	Trp	Glu	Asn	Ala	Gly	Lys	Tyr	Ala	Arg	Leu	Lys
785					790					795					800
Asp	Ile	Ser	Cys	Glu	Val	Lys	Glu	Asp	Ser	Val	Leu	Val	Lys	Thr	Ala
				805					810					815	
Phe	Thr	Leu	Pro	Val	Ala	Leu	Lys	Gly	Asp	Leu	Thr	Val	Thr	Tyr	Glu
			820					825					830		
Val	Asp	Gly	Arg	Gly	Lys	Ile	Ala	Val	Thr	Ala	Asp	Phe	Pro	Gly	Ala
		835					840					845			
Glu	Glu	Ala	Gly	Leu	Leu	Pro	Ala	Phe	Gly	Leu	Asn	Leu	Ala	Leu	Pro
	850					855					860				
Lys	Glu	Leu	Thr	Asp	Tyr	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Gly	Pro	Asn	Glu	Ser
865					870					875					880

REVENDICATIONS

1. Souche mutante de *L. bulgaricus* dépourvue d'activité β -galactosidase, caractérisée en ce qu'elle porte une mutation non-sens dans la séquence codant pour la β -galactosidase.
2. Souche mutante de *L. bulgaricus* selon la revendication 1, déposée le 14 janvier 1998, auprès de la CNCM sous le numéro I-1968.
- 10 3. Ferment lactique, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une souche de *L. bulgaricus* selon la revendication 1 ou 2.
4. Ferment lactique selon la revendication 3 caractérisé en ce que ladite souche de *L. bulgaricus* est associée à au moins une souche de *S. thermophilus*.
5. Procédé de préparation d'un produit laitier fermenté, caractérisé en ce qu'il comprend une étape au cours de laquelle on fermente du lait à l'aide d'un ferment lactique comprenant au moins une souche de *L. bulgaricus* selon la revendication 1 ou 2, en présence d'au moins un sucre assimilable par ladite souche.
- 20 6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que ledit sucre assimilable est le glucose.
7. Procédé selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce que l'arrêt de la fermentation s'effectue sans refroidissement dudit produit laitier.
8. Produit laitier fermenté obtenu par un procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 7.

9. Produit laitier fermenté selon la revendication 8, caractérisé en ce que ledit produit est un yogourt.

FIGURE I

