

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 728 588

②① N° d'enregistrement national : **94 15543**

⑤① Int Cl[®] : C 12 Q 1/04

CETTE PAGE ANNULE ET REMPLACE LA PRECEDENTE

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 21.12.94.

③⑦ Priorité :

⑦① Demandeur(s) : UNIVERSITE DE BOURGOGNE —
FR.

⑦② Inventeur(s) : MONNET CHRISTOPHE, DIVIES
CHARLES et SCHMITT PHILIPPE.

④③ Date de la mise à disposition du public de la
demande : 28.06.96 Bulletin 96/26.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule.*

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire : CABINET CLAUDE GUIU.

⑤④ **PROCEDE DE SELECTION DE SOUCHES BACTERIENNES PRODUCTRICES DE DIACETYLE.**

⑤⑦ Procédé de sélection de souches bactériennes défi-
cientes en α -acétolactate décarboxylase en vue de favori-
ser la production de diacétyl caractérisé en ce que l'on
met ladite bactérie en présence d'hydroxylamine, et en ce
que l'on détecte le diméthylglyoxime éventuellement formé,
et *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*
ainsi obtenu.

L'invention concerne aussi l'utilisation d'un tel procédé
pour la production d'un ferment aromatisant utilisable dans
l'industrie alimentaire.

FR 2 728 588 - A1



PROCEDE DE SELECTION DE SOUCHES BACTERIENNES
PRODUCTRICES DE DIACETYLE

La présente Invention est relative à un procédé de sélection de souches bactériennes déficientes en α -acétolactate décarboxylase, en vue de favoriser la production de diacétyl.

5 Le diacétyl est un arôme recherché dans certains produits alimentaires tels que le beurre, la crème fraîche, les fromages frais et certains laits fermentés. Dans ces produits, la concentration en diacétyl est le plus souvent inférieure à 5 mg/l.

10 Dans les produits laitiers, le diacétyl est principalement synthétisé à partir de l'acide citrique, présent naturellement dans le lait à une concentration voisine de 1,7 g/l. Les ferments aromatisants utilisés dans les procédés de fabrication contiennent généralement
15 des souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ou de *Leuconostoc* spp., capables d'utiliser l'acide citrique. L'acide citrique donne lieu à la formation d' α -acétolactate, qui est le précurseur du diacétyl.

20 L' α -acétolactate est un composé instable, qui se décarboxyle spontanément en diacétyl, ou en acétoïne. Le diacétyl est formé dans des conditions oxydatives, par exemple en présence d'oxygène. En conditions non-oxydatives, se forme de l'acétoïne qui ne possède pas les
25 propriétés aromatiques du diacétyl.

L' α -acétolactate décarboxylase est une enzyme qui décarboxyle l' α -acétolactate en acétoïne, au détriment du diacétyl.

Plusieurs procédés de production d'arômes font
30 intervenir la synthèse d' α -acétolactate par des microorganismes. L' α -acétolactate produit peut ensuite être transformé en diacétyl, par exemple par une distillation en présence d'oxygène (JÖNSSON H. et al., *Milchwissenschaft*, 1980, 31, 8, 658-662). Dans le cas de
35 la fabrication de beurre selon le procédé "NIZO"

(développé par le Netherland Institute for Dairy Research) la production d' α -acétolactate par le ferment est due à la présence dans ledit ferment d'une souche de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* naturellement déficiente en α -acétolactate décarboxylase. En culture dans du lait, cette souche produit des quantités élevées d' α -acétolactate, contrairement aux souches possédant une α -acétolactate décarboxylase (Hugenholtz J. et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 1992 38, 17-22).

Il a également été proposé d'utiliser l' α -acétolactate synthase, qui est l'enzyme responsable de la formation d' α -acétolactate à partir du pyruvate, dans une souche déficiente en α -acétolactate décarboxylase, pour augmenter encore la production d' α -acétolactate (Demande de Brevet Européen n° 500 188, aux noms d'Unilever N.V. et Unilever PLC).

Il serait intéressant de pouvoir disposer d'autres mutants déficients en α -acétolactate décarboxylase, en particulier de mutants réalisée à partir de souches ayant des caractéristiques technologiques intéressantes pour les procédés de fabrication concernés (produits laitiers) (résistance aux phages, activité acidifiante, activité protéolytique ...).

L'acide nucléique codant pour l' α -acétolactate décarboxylase de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* a été cloné et séquencé (Demande de Brevet Français 2 696 191 au nom de l'INRA). Cette Demande de Brevet Français 2 696 191 décrit également des procédés de préparation de bactéries lactiques du type *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* chez lesquelles l' α -acétolactate décarboxylase a été inactivée par génie génétique.

Cependant, les techniques de génie génétique sont relativement lourdes à mettre en oeuvre ; la sélection des microorganismes obtenus nécessite l'utilisation d'un gène marqueur ; en outre, l'utilisation de microorganismes recombinants fait l'objet de réglementations contraignantes.

Une autre méthode pour l'obtention de mutants déficients en α -acétolactate décarboxylase consiste à procéder à une mutagénèse aléatoire à partir de la souche de microorganisme dont on souhaite obtenir les mutants ;
5 dans ce cas, la principale difficulté consiste à repérer spécifiquement les mutants possédant les caractéristiques souhaitées.

La présente Invention a pour but de permettre la détection de bactéries lactiques déficientes en α -
10 acétolactate décarboxylase, et par conséquent le criblage et la sélection des bactéries mutantes. Ce procédé fait appel à la détection, dans le milieu de culture, du diacétyl produit par les bactéries portant la mutation recherchée.

15 La présente Invention a pour objet un procédé de détection de la production de diacétyl par une bactérie, caractérisé en ce que l'on met ladite bactérie en présence d'hydroxylamine, et en ce que l'on détecte le diméthylglyoxime formé par réaction du diacétyl
20 éventuellement produit et de l'hydroxylamine.

Le diméthylglyoxime formé peut ensuite être détecté, par exemple, par formation d'un complexe de coloration rouge, en présence de sulfate de fer et d'ammoniaque.

25 Selon un mode de mise en oeuvre préféré du procédé conforme à l'Invention, il s'agit d'un procédé de criblage ou de sélection, sur milieu gélosé, des colonies bactériennes produisant du diacétyl. Il peut toutefois être appliqué au criblage des cultures en milieu non
30 gélosé, par exemple à la sélection de clones sur plaques de microtitration.

Selon un autre mode de mise en oeuvre préféré du procédé conforme à l'Invention, on procède à la détection de la production de diacétyl après avoir soumis ladite
35 bactérie à un traitement mutagène.

Ce traitement mutagène peut être effectué par tout moyen connu en lui même ; il peut s'agir de mutagénèse chimique, de mutagénèse par irradiation, ou de mutagénèse

par insertion ou délétion de séquences d'acide nucléique. Il peut s'agir d'un traitement de mutagénèse aléatoire, mais il peut s'agir également de mutagénèse dirigée.

Par exemple, pour utiliser le procédé conforme à l'Invention pour la détection de bactéries lactiques déficientes en α -acétolactate décarboxylase ; on opère comme suit :

Les cellules ayant subi une mutagénèse sont inoculées sur des boîtes de Pétri, de manière à former des colonies. Le milieu de culture utilisé permet la production d' α -acétolactate par les mutants déficients en α -acétolactate décarboxylase. L' α -acétolactate est en partie transformé par décarboxylation chimique oxydative en diacétyl en raison de l'incubation des boîtes de Pétri en conditions aérobies. Les souches possédant l' α -acétolactate décarboxylase produisent peu de diacétyl dans ces conditions et n'induisent pas de coloration autour des colonies. Les souches produisant de l' α -acétolactate sont donc aisément mises en évidence dans ce criblage.

Le diacétyl réagit avec de l'hydroxylamine pour former du diméthylglyoxime. Le diméthylglyoxime forme ensuite un complexe fortement coloré en rouge en présence de sulfate de fer et d'ammoniaque. Comme cette série de réactions chimiques est létale pour les microorganismes, on effectue préalablement au criblage, des répliques des boîtes de Pétri. Les colonies révélées par le criblage sont ensuite récupérées sur ces répliques.

Le procédé de détection conforme à l'Invention peut également être utilisé pour le criblage et l'obtention de souches dans lesquelles l' α -acétolactate décarboxylase a été suffisamment atténuée, sans avoir été totalement inactivée, dès lors que la production d' α -acétolactate par ces souches est plus élevée que chez les souches parentales.

Parmi les souches mutantes sélectionnées, on peut citer de manière préférée, la souche F2M2 déposée en date du 20 décembre sous le n° I - 1510 auprès de la

Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) tenue par l'INSTITUT PASTEUR.

De manière générale, le procédé conforme à l'Invention peut être utilisé dans toute procédure de
5 criblage de la production d' α -acétolactate par des microorganismes, dès lors que ce criblage est basé sur une détection spécifique du diacétyle.

L'Invention concerne également l'utilisation du procédé de détection de la production d' α -acétolactate
10 pour des microorganismes autres que *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis*, par exemple pour les bactéries lactiques des genres *Leuconostoc* ou *Lactobacillus*. Les souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ne sont pas les seules
15 souches capables de produire du diacétyle. La stimulation de la production d' α -acétolactate et de diacétyle par une inactivation de l' α -acétolactate décarboxylase est envisageable pour d'autres espèces bactériennes.

De manière avantageuse, ledit procédé de détection
20 permet de sélectionner des bactéries lactiques déficientes en α -acétolactate décarboxylase, aptes à être utilisées comme ferment aromatisant.

De tels ferments aromatisants sélectionnés conformément à la présente invention sont de préférence
25 utilisés dans la préparation de fromages frais, de laits fermentés, de crème maturée et de beurre.

De manière avantageuse, lesdits ferments comprennent soit des leuconostocs, soit des lactocoques, sélectionnés conformément à l'invention, seuls ou en
30 mélange.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la
35 présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de

l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

EXEMPLE : OBTENTION DE SOUCHES DE *LACTOCOCCUS LACTIS* SUBSP. *LACTIS* BIOVAR. *DIACETYLLACTIS* PRODUISANT DE
5 **L' α -ACETOLACTATE.**

1. MUTAGENESE

Une souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetyllactis* est cultivée à 30°C dans 5 ml de bouillon MRS (DE MAN J.C. et al. J. Appl. Bacteriol.,
10 1960, 23, 130-135). La culture est arrêtée en fin de phase exponentielle, puis les cellules sont récupérées par centrifugation, lavées avec du tampon phosphate 100 mM (pH 7), et récupérées avec 0,5 ml de ce même tampon. Un volume de 0,5 ml d'une solution de N-méthyl-N'-nitro-
15 N-nitrosoguanidine (NTG) est ajouté à la suspension cellulaire ; le mélange est alors incubé 1 h à 30°C (la concentration de la solution de NTG est ajustée de manière à obtenir 10% de survie au traitement mutagène). Les cellules sont ensuite récupérées par centrifugation,
20 lavées avec 5 ml de tampon et reprises dans 5 ml de bouillon MRS. La suspension cellulaire est ensuite incubée 1 h à 30°C, puis elle est diluée dans une solution de chlorure de sodium à 0,9%. Cette suspension est destinée à ensemercer les boîtes de Pétri pour le
25 criblage.

2. INOCULATION DES BOITES DE PETRI

200 boîtes de Pétri sont utilisées. Leur préparation est décrite ci-dessous.

Les composants suivants sont mélangés dans 950 ml
30 d'eau distillée : 5 g d'extrait de levure, 10 g de polypeptone, 2 g de K_2HPO_4 , 200 mg de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 mg de $MnSO_4 \cdot 4H_2O$, 15 g de citrate trisodique, $2H_2O$ et 15 g d'agar. Le pH est ajusté à 6,5 et la gélose est autoclavée 15 min à 121°C. Avant de couler les boîtes de
35 Pétri, on ajoute, pour 950 ml de milieu maintenu à 50°C, 50 ml d'une solution autoclavée de glucose à 400 g/l. On verse approximativement 12 ml de gélose par boîte de Pétri.

Les 200 boîtes de Pétri sont inoculées avec la suspension cellulaire provenant de la mutagénèse. L'inoculation est réalisée, de manière à obtenir environ 60 colonies par boîte de Pétri. Les boîtes de Pétri sont
5 ensuite incubées 60 h à 30°C, afin de permettre le développement des colonies.

3. CRIBLAGE

Des répliques sur velours des boîtes de Pétri sont effectuées. Ces répliques permettent la récupération des
10 colonies détectées par le criblage. Les boîtes de Pétri sont ensuite recouvertes de 6 ml d'une sur-couche contenant de l'agar et de l'hydroxylamine, maintenue en surfusion à 60°C (210 g/l NH_2HCl /50 g/l agar ; 1/1, vol/vol ; les deux solutions sont mélangées
15 extemporanément). Après la prise en masse de la surcouche d'agar, les boîtes de Pétri sont incubées 30 min à 75°C pour permettre la formation du diméthylglyoxime à partir du diacétyle et de l'hydroxylamine.

Les boîtes de Pétri sont ensuite retirées de
20 l'étuve et l'on verse 8 ml d'une solution d'acétone-phosphate (200 ml d'acétone et 150 g de K_2HPO_4 par litre de solution) dans chaque boîte de Pétri encore chaude. Cette opération est destinée à fixer l'excès d'hydroxylamine et à permettre un meilleur développement
25 ultérieur de la coloration.

Après 15 min environ, l'acétone-phosphate est éliminé et on ajoute à chaque boîte de Pétri 9 ml d'un mélange extemporané de deux solutions : (500 g/l sodium-potassium tartrate / NH_4OH ; 3/1, vol/vol) / (50 g/l
30 $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dans 1% H_2SO_4 ; 8/1, vol/vol). L'ajout de cette solution a pour effet de former un complexe coloré rouge à partir du diméthylglyoxime. La couleur rouge atteint son maximum environ 10 min après l'ajout du réactif et elle persiste environ 1 h. Pour faciliter le criblage,
35 les réactifs utilisés sont répartis dans les boîtes de Pétri à l'aide d'un distributeur automatique. De plus, après l'incubation à 75°C, toutes les opérations sont réalisées sous une hotte chimique. Les boîtes de Pétri

sont examinées sur une table lumineuse. Les colonies entourées d'un halo rouge sont repérées. Ces colonies sont récupérées à partir des répliques des boîtes de Pétri effectuées avant le criblage.

5 Les Tableaux I et II et les Figures 1 et 2 illustrent des expériences de mutagénèse et de caractérisation des mutants obtenus à partir de trois souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

10 - Le tableau I illustre les résultats des mutagénèses obtenus avec trois souches de *Lactococcus lactis lactis* ;

- Le tableau II illustre les mesures de l'activité α -acétolactate décarboxylase des mutants et des souches parentales, ainsi que la production d' α -acétolactate dans
15 du lait.

- Les figures 1 et 2 représentent une cinétique de production d' α -acétolactate et de (diacétyl plus acétoïne) dans du lait d'une souche de *Lactococcus lactis*
20 subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* (figure 1), ainsi que d'un mutant obtenu à partir de cette souche (figure 2).

Tableau I : Criblage de la production d' α -acétolactate par des colonies issues de la mutagénèse de 3 souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*.

5

	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	Concentration en NTG ($\mu\text{g/ml}$)	Nombre de colonies testées	Nombre de colonies positives
10	CD	300	5000	1
	F2	200	14000	3
	F5	20	12000	2

Les souches de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* utilisées dans les mutagénèses décrites dans le tableau I (CD, F2 et F5) proviennent du Centre de Recherche International André Gaillard - Yoplaît (Ivry-sur-Seine, France).

Les souches CD, F2 et F5 sont aptes à utiliser le lactose et le citrate ; seules les souches CD et F2 présentent en outre des caractéristiques de protéolyse.

La mutagénèse est réalisée, conformément au point 1. ci-dessus. Les concentrations en NTG sont ajustées, de manière à obtenir 10 % de survie à la mutagénèse ; ce Tableau I montre que la souche F5 est beaucoup plus sensible au NTG que les souches CD et F2.

Tableau II : Caractéristiques des souches parentales (CD, F2 et F5) et des souches sélectionnées après mutagénèse (CDM1, F2M1, F2M2, F2M3, F5M1, F5M2).

30

	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> biovar. <i>diacetylactis</i>	Activité α -acétolactate décarboxylase (U/mg)	Production maximale d' α -acétolactate (mM)
5	CD	0,561	<0,10
	CDM1	<0,002	2,38
	F2	0,628	<0,10
	F2M1	<0,002	2,28
	F2M2	<0,002	2,20
10	F2M3	<0,002	2,30
	F5	1,610	<0,10
	F5M1	<0,002	2,46
	F5M2	<0,002	2,12

La fréquence d'apparition de colonies positives après une mutagénèse telle que décrite précédemment est de l'ordre de 1 pour 5000. Les colonies sélectionnées ont été caractérisées au niveau enzymatique, par la mesure de l'activité α -acétolactate décarboxylase, à partir d'extraits acellulaires, avec une concentration de 50mM de D- α -acétolactate et en présence de 40mM de leucine et pour leur capacité à produire de l' α -acétolactate ; les 6 clones révélés par le criblage ne possèdent plus d'activité α -acétolactate décarboxylase (tableau II). Lorsqu'ils sont inoculés dans du lait (à 10^7 ufc/ml, culture à 23°C), ils produisent de l' α -acétolactate, à une concentration moyenne de 2,3 mM, alors que les souches parentales en produisent moins de 0,1 mM (tableau II).

La cinétique d'une culture de la souche parentale *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* F2 dans du lait (figure 1) montre les caractéristiques suivantes :

- La souche acidifie le lait à un pH inférieur à 4,5 en raison de la formation d'acide lactique à partir du lactose.

- L'acide citrique du lait est consommé par la souche F2.

- Aucune production α -acétolactate n'est détectée.

- On observe une production des composés issus de la décarboxylation de l' α -acétolactate (diacétyl plus acétoïne, non dissociables dans le dosage utilisé),
5 jusqu'à l'épuisement de l'acide citrique. Une étude plus détaillée montrerait que la concentration de l'acétoïne est beaucoup plus élevée que celle du diacétyl, en raison de la présence de l' α -acétolactate décarboxylase, qui transforme l' α -acétolactate en acétoïne uniquement.

10 La cinétique d'une culture du mutant F2M2 (figure 2), isolé à partir de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* F2 et sélectionné en mettant en oeuvre le procédé de l'Invention, montre les caractéristiques suivantes :

15 - La souche F2M2 acidifie le lait et consomme l'acide citrique de façon similaire à la souche parentale.

- On observe une production importante d' α -acétolactate jusqu'à épuisement de l'acide citrique. La
20 production de cet intermédiaire métabolique est due à l'absence de l'activité α -acétolactate décarboxylase chez la souche F2M2.

- L' α -acétolactate se dégrade ensuite lentement par une décarboxylation chimique, ne faisant pas intervenir
25 l' α -acétolactate décarboxylase, en acétoïne et/ou en diacétyl, de sorte que la somme diacétyl plus acétoïne plus α -acétolactate reste quasiment constante. En présence d'oxygène, la formation de diacétyl à partir de l' α -acétolactate est favorisée. Dans le cas contraire,
30 l' α -acétolactate se transforme surtout en acétoïne.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en oeuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en
35 embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

REVENDEICATIONS

1 - Procédé de détection de la production de diacétyl par une bactérie, *caractérisé* en ce que l'on met ladite bactérie en présence d'hydroxylamine, et en ce que
5 l'on détecte le diméthylglyoxime éventuellement formé.

2 - Procédé selon la revendication 1, *caractérisé* en ce qu'il est mis en oeuvre pour la sélection de bactéries produisant du diacétyl.

3 - Procédé selon la revendication 2, *caractérisé*
10 en ce qu'il est mis en oeuvre sur une culture bactérienne en milieu gélosé, pour le criblage des colonies bactériennes produisant du diacétyl.

4 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, *caractérisé* en ce que l'on procède
15 à la détection de la production de diacétyl après traitement mutagène de ladite bactérie.

5 - Procédé selon la revendication 4, *caractérisé* en ce que ledit traitement mutagène est un traitement de mutagénèse aléatoire.

20 6 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, *caractérisé* en ce que ladite bactérie est une bactérie lactique.

7 - Procédé selon la revendication 6, *caractérisé* en ce que ladite bactérie lactique est choisie dans le
25 groupe constitué par *Lactococcus*, *Leuconostoc* ou *Lactobacillus*.

8 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 6 ou 7, *caractérisé* en ce que ladite bactérie est du type *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
30 biovar. *diacetylactis*.

9 - *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* obtenu selon le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, déposé en date du 20 décembre 1994 sous le n° I - 1510 auprès de la Collection
35 Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM) tenue par l'INSTITUT PASTEUR.

10 - Utilisation d'un procédé de détection de la production de diacétyl selon l'une quelconque des

revendications 1 à 8, pour la sélection de bactéries lactiques déficientes en α -acétolactate décarboxylase.

11 - Utilisation d'un procédé de détection de la production de diacétyl selon l'une quelconque des
5 revendications 1 à 8, pour la production d'un ferment aromatisant.

12 - Utilisation d'un procédé de détection de la production de diacétyl selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, pour la sélection de bactéries
10 aptes à être utilisées dans l'industrie alimentaire.

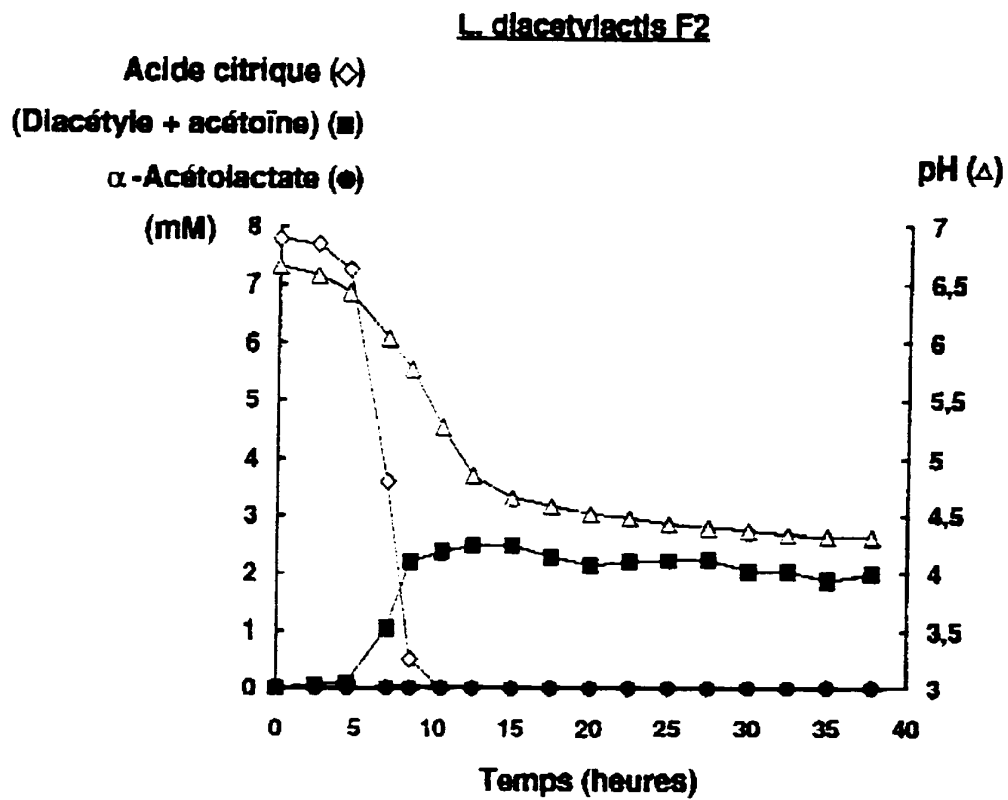


FIGURE 1

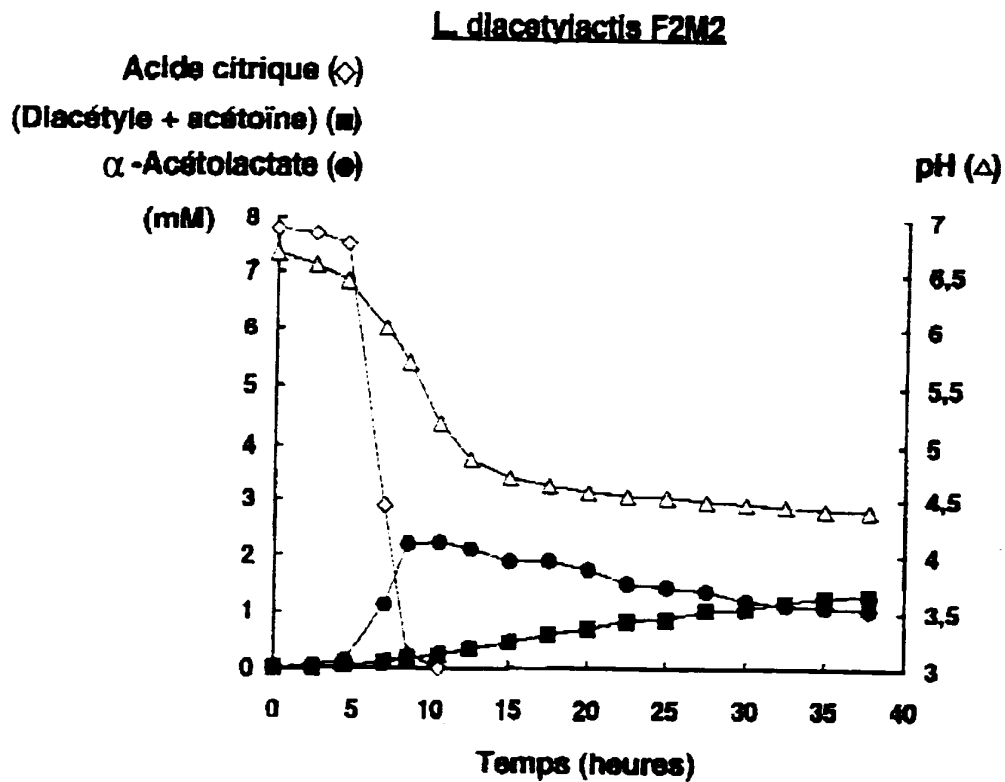


FIGURE 2

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 47, no. 12, 1983 TOKYO JP, pages 2755-2759, T. MIYAMOTO ET AL. 'Induction of mutation in Lactobacillus casei subesp. alactosus by Nitrosoguanidina.' * le document en entier *	1-8, 10-12
X	JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, vol. 47, 1964 CHAPAIN, ILLINOIS US, pages 981-985, PACK ET AL. 'Owades and Jakovac method for diacetyl determination in mixed-strain starters.' * le document en entier *	1
Y	JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, vol. 73, 1990 CHAPAIN, ILLINOIS US, pages 1450-1453, BEDNARSKI ET AL. 'Selection of Lactobacillus mutants for their a-dicarbonyl production.' * le document en entier *	1-8, 10-12
Y	EP-A-0 500 188 (UNILEVER N. V.) 26 Août 1992	1-8, 10-12
D,A	APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., vol. 38, 1992 pages 17-22, HUGENHOLTZ ET AL. 'Diacetyl production by different strains of Lactococcus lactis subesp. lactis var. diacetalys and Leuconostoc spp.'	1-8, 10-12
A		
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL. 6)
		C12Q C12R C12P
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
6 Septembre 1995		Cartagena y Abella,P
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant		