



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2006/07/11
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2007/01/18
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2008/01/11
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2006/001687
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2007/006969
(30) Priorité/Priority: 2005/07/13 (FR0507528)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *A23C 9/123* (2006.01),
A23B 7/10 (2006.01), *A23C 11/10* (2006.01),
A23C 9/12 (2006.01), *A23L 1/211* (2006.01),
A23L 1/238 (2006.01)
(71) Demandeur/Applicant:
COMPAGNIE GERVAIS DANONE, FR
(72) Inventeurs/Inventors:
TERRAGNO, LUC, FR;
DEBRU, FRANCOIS, FR;
TESSIER, PHILIPPE, FR;
HERVE, STEPHANE, ES;
BLACHON, JEAN-LUC, FR
(74) Agent: GOUDREAU GAGE DUBUC

(54) Titre : PRODUITS ALIMENTAIRES FERMENTES CONTENANT DES SOUCHES PROBIOTIQUES, ET LEUR
PROCEDE DE PREPARATION
(54) Title: FERMENTED FOOD PRODUCTS CONTAINING PROBIOTIC STRAINS AND METHOD FOR PREPARING
SAME

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention concerne principalement un produit alimentaire fermenté non ferme contenant des ferments comportant plus d'environ $5 \cdot 10^7$, en particulier plus d'environ 10^8 bifidobactéries par gramme de produit alimentaire fermenté pendant une période de conservation d'au moins 30 jours, en particulier d'au moins 35 jours.



(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
18 janvier 2007 (18.01.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/006969 A1

(51) Classification internationale des brevets :

A23C 9/123 (2006.01) A23L 1/238 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01) A23B 7/10 (2006.01)
A23L 1/211 (2006.01) A23C 11/10 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2006/001687

(22) Date de dépôt international : 11 juillet 2006 (11.07.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

0507528 13 juillet 2005 (13.07.2005) FR

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

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **TER-RAGNO, Luc** [FR/FR]; 22, rue de Rushmoor, F-92190 Meudon (FR). **DEBRU, François** [FR/FR]; 12, rue Delly, F-78000 Versailles (FR). **TESSIER, Philippe** [FR/FR]; 12, sente des Chataigniers, F-91120 Palaiseau (FR). **HERVE, Stéphane** [FR/ES]; Arturo Soria, 142 (3b), E-28043 Madrid (ES). **BLACHON, Jean-Luc** [FR/FR]; 8, rue de l'Adjudant Flick, F-94300 Bry-sur-Marne (FR).

(74) Mandataires : **GROSSET-FOURNIER, Chantal, Catherine** etc.; Grosset-Fournier & Demachy Sarl, 54, rue Saint-Lazare, F-75009 Paris (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, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

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: FERMENTED FOOD PRODUCTS CONTAINING PROBIOTIC STRAINS AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) Titre : PRODUITS ALIMENTAIRES FERMENTES CONTENANT DES SOUCHES PROBIOTIQUES, ET LEUR PROCEDE DE PREPARATION

(57) Abstract: The invention concerns mainly a non-solid fermented food product containing ferments comprising about $5 \cdot 10^7$, in particular more than about 10^8 bifidobacteria per gram of food product fermented for a shelf lifetime of at least 30 days, in particular of at least 35 days.

(57) Abrégé : L'invention concerne principalement un produit alimentaire fermenté non ferme contenant des ferments comportant plus d'environ $5 \cdot 10^7$, en particulier plus d'environ 10^8 bifidobactéries par gramme de produit alimentaire fermenté pendant une période de conservation d'au moins 30 jours, en particulier d'au moins 35 jours.



WO 2007/006969 A1

PRODUITS ALIMENTAIRES FERMENTES CONTENANT DES SOUCHES PROBIOTIQUES, ET LEUR PROCEDE DE PREPARATION

L'invention concerne des produits alimentaires fermentés contenant des souches probiotiques, et leur procédé de préparation.

Les bifidobactéries font partie de la flore anaérobie dominante du colon. Les principales espèces présentes dans le colon humain sont *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum ssp infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*.

Les bifidobactéries sont des bactéries probiotiques de choix. Des bactéries du genre *Bifidobacterium* sont utilisées dans de nombreux produits actuellement sur le marché et sont souvent ajoutées à des produits laitiers comprenant déjà les bactéries classiques du yaourt (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*).

La consommation de bifidobactéries est reconnue comme étant bénéfique dans les processus de rétablissement de la population normale de bifidobactéries chez des personnes ayant subi une antibiothérapie. Cette consommation semble aussi permettre de réduire les constipations, de prévenir la survenue de diarrhée et de diminuer les symptômes de l'intolérance au lactose.

Les probiotiques sont des bactéries vivantes. L'utilisation de ces bactéries vivantes dans la fabrication de produits alimentaires tels que des produits laitiers est délicate notamment par rapport aux problématiques de survie de ces bactéries dans le produit.

80% des produits actuellement sur le marché qui contiennent des bifidobactéries ne respectent pas les critères permettant de soutenir qu'ils améliorent de façon significative le transit intestinal des personnes les consommant. Une prise journalière d'au moins 10^8 à 10^9 cellules viables a été recommandée comme dose minimale permettant d'avoir un effet thérapeutique (Silva A.M., Barbosa F. H., Duarte R., Vieira L. Q., Arantes R. M., Nicoli J. R., Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice, J. Appl. Microbiol. 97 (2004) 29-37). La dose requise peut être dépendante de la souche probiotique utilisée.

Dans le cas de la fabrication d'un produit alimentaire bioactif contenant des bifidobactéries se pose donc le problème d'obtenir une population suffisante de ces bactéries dans le produit et de la maintenir au cours de la « vie » du produit.

Le problème de la taille numérique de la population de souches probiotiques dans un produit laitier fermenté est un problème connu (voir notamment D. Roy, Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products, Lait 85 (2005) 39-56, INRA, EDP Sciences).

Plusieurs raisons à ce problème ont été évoquées parmi lesquelles la diminution de la population pendant le stockage, la croissance perturbée de ces bactéries à partir d'un certain pH ou tout simplement la mauvaise capacité de croissance de ces bifidobactéries, en particulier dans le lait.

L'invention a principalement pour but de fournir des produits alimentaires fermentés non fermes contenant une forte population de bifidobactéries pendant toute la période de conservation desdits produits alimentaires fermentés, c'est à dire des produits alimentaires fermentés non fermes contenant des bifidobactéries en bon état physiologique et présentant un taux de survie important au cours de la période de conservation desdits produits alimentaires fermentés, en particulier jusqu'à la date limite de consommation des produits.

Un autre but de l'invention est de fournir des procédés de préparation simples à mettre en œuvre permettant d'obtenir les produits ci-dessus.

Un autre but de l'invention est de favoriser la croissance des bifidobactéries par rapport aux symbioses classiques présentes dans les yaourts, ces symbioses étant constituées classiquement d'une ou plusieurs souches de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus*.

Les buts de l'invention sont réalisés grâce à la constatation surprenante effectuée par les inventeurs qu'un réglage précis d'un certain nombre de paramètres intervenant classiquement dans les procédés de préparation de produits alimentaires fermentés non fermes permet d'obtenir rapidement après fermentation des populations d'au moins 10^8 bifidobactéries par gramme de produit, et une survie accrue des bifidobactéries jusqu'à la date limite de consommation des produits, sans forcément modifier la croissance des autres souches bactériennes.

L'invention concerne un produit alimentaire fermenté non ferme contenant des ferments, lesquels contiennent des bactéries lactiques, comportant plus d'environ 5.10^7 , en particulier plus d'environ 10^8 bifidobactéries par gramme de produit alimentaire fermenté pendant une période de conservation d'au moins 30 jours, en particulier d'au moins 35 jours.

Par « produit alimentaire fermenté non ferme » on entend un produit alimentaire fermenté qui a subi une étape de décaillage et / ou de lissage lors de son procédé de préparation et ce préalablement à son conditionnement.

Un produit alimentaire fermenté ferme est un produit qui est conditionné avant la fermentation, la fermentation intervenant dans le récipient de conditionnement. Ainsi, pour un produit laitier, le lait estensemencé et directement conditionné dans des pots où il fermente. Après l'ensemencement, le laitensemencé est conditionné en pots. Ces pots passent généralement à l'étuve pendant 3 heures. Les bactéries se reproduisent et consomment le lactose qui est alors transformé partiellement en acide lactique ce qui modifie la structure des protéines, formant ce que l'on appelle un gel lactique. Ensuite les produits passent en chambre froide ventilée ou en tunnel de refroidissement et sont stockés à environ 4°C.

Des exemples de produits alimentaires fermentés non fermes sont : les yaourts brassés ou les yaourts à boire.

Par « ferments » on entend un ensemble de bactéries, notamment des bactéries destinées à la fermentation et / ou des bactéries à valeur probiotique.

La période de conservation ou de stockage du produit alimentaire fermenté est la période qui suit immédiatement la fin de processus de préparation du produit alimentaire fermenté et son conditionnement. Lors de cette période de conservation le produit alimentaire fermenté est habituellement conservé à une température comprise entre environ 4 et environ 10 °C.

Le produit alimentaire fermenté susmentionné contient plus d'environ $5 \cdot 10^7$, en particulier plus d'environ 10^8 bifidobactéries par gramme de produit alimentaire fermenté en particulier pendant une période de conservation d'au moins 35 jours, et plus particulièrement pendant une période de conservation d'au moins 40 jours. Plus particulièrement le produit alimentaire fermenté susmentionné contient plus d'environ $5 \cdot 10^7$, en particulier plus d'environ 10^8 bifidobactéries par gramme de produit alimentaire fermenté jusqu'à la date limite de consommation du produit.

Les dates limites de consommation dépendent des durées légales de conservation fixées par la législation en vigueur, qui peuvent typiquement varier de 15 à 50 jours à partir de la date de fabrication. A titre d'exemple, la durée légale de conservation est généralement de 30 jours pour les produits laitiers frais.

Une population de bifidobactéries qui est supérieure ou égale à 10^8 UFC/g à la date limite de consommation (D.L.C.) du produit conservé entre 4 et 10°C peut être

considérée comme une population suffisante de bifidobactéries compte tenu des recommandations médicales concernant l'apport en bifidobactéries dans l'alimentation.

L'invention concerne plus particulièrement le produit alimentaire fermenté tel que défini ci-dessus, dans lequel le rapport entre le nombre de bifidobactéries contenues dans le produit alimentaire fermenté à l'issue de la période de conservation et le nombre de bifidobactéries contenues dans le produit alimentaire fermenté au début de la période de conservation d'au moins 30 jours, en particulier d'au moins 35 jours, est d'environ 0,2 à environ 0,8, en particulier d'environ 0,3 à environ 0,7, en particulier d'environ 0,4 à environ 0,5.

En d'autres termes le taux de survie des bifidobactéries contenues dans le produit alimentaire fermenté entre le début de la période de conservation (c'est à dire la fin du procédé de préparation) et la fin de la période de conservation est compris entre 20 et 80 %, en particulier entre 30 et 70 %, et en particulier entre 40 et 50 %.

Ladite période de conservation est d'au moins 30 jours, en particulier d'au moins 35 jours, mais plus particulièrement d'au moins 40 jours ou s'étend jusqu'à la date limite de consommation du produit alimentaire fermenté.

L'invention concerne également un produit alimentaire fermenté non ferme conservé pendant une période de conservation d'au moins 30 jours, en particulier d'au moins 35 jours, à une température d'environ 4 à environ 10 °C, contenant des ferments comportant plus d'environ 10^8 bifidobactéries par gramme de produit alimentaire fermenté.

Plus particulièrement l'invention concerne un produit alimentaire fermenté non ferme conservé pendant une période de conservation d'au moins 30 jours, en particulier d'au moins 35 jours, en particulier d'au moins 40 jours, à une température de moins de 12°C ou de moins de 10°C, contenant des ferments comprenant plus d'environ $5 \cdot 10^7$, en particulier plus d'environ 10^8 bifidobactéries par gramme de produit alimentaire fermenté.

L'invention concerne plus particulièrement un produit alimentaire fermenté tel que défini ci-dessus, contenant plus d'environ $5 \cdot 10^7$, en particulier plus d'environ 10^8 bifidobactéries par gramme de produit alimentaire fermenté au début de la période de conservation.

Produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 1 à 4, dans lequel les bifidobactéries contenues dans le produit alimentaire fermenté sont du type *Bifidobacterium animalis*, notamment *Bifidobacterium animalis animalis* et / ou

Bidifobacterium animalis lactis, et / ou *Bifidobacterium breve* et / ou *Bifidobacterium longum* et / ou *Bidifobacterium infantis* et / ou *Bidifobacterium bifidum*.

Avantageusement, le produit alimentaire fermenté tel que défini ci-dessus est préparé à base de jus végétal et notamment de jus de fruit ou de jus de légume tel que du jus de soja, ou de produit laitier, et notamment de lait de vache et / ou de lait de chèvre.

Ledit produit alimentaire fermenté peut également être à base de lait de brebis ou de lait de chamelle ou de lait de jument.

Par jus végétal on entend un jus réalisé à partir d'extraits végétaux, notamment de soja, de tonyu, d'avoine, de blé, de maïs...

Des exemples de jus de légume sont : le jus de tomate, le jus de betterave, le jus de carotte...

Des exemples de jus de fruit sont : le jus de pomme, d'orange, de fraise, de pêche, d'abricot, de prune, de framboise, de mûre, de groseille, d'ananas, de citron, d'agrumes, de pamplemousse, de banane, de kiwi, de poire, de cerise, de fruit de la passion, de mangue, de fruit exotique, le jus multifruit...

Selon un mode de réalisation avantageux, le produit alimentaire fermenté tel que défini ci-dessus est tel que les ferments contiennent des bactéries lactiques, en particulier une ou des bactéries du genre *Lactobacillus spp.* et notamment *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* et / ou *Lactobacillus casei* et / ou *Lactobacillus reuteri* et / ou *Lactobacillus acidophilus* et / ou *Lactobacillus helveticus* et / ou *Lactobacillus plantarum*, et / ou des bactéries du type *Lactococcus cremoris* et / ou *Streptococcus thermophilus* et / ou *Lactococcus lactis* et / ou une ou des bactéries du genre *Leuconostoc*.

Selon un mode de réalisation avantageux, le produit alimentaire fermenté tel que défini ci-dessus est tel que les ferments contiennent des bactéries lactiques qui présentent entre elles un phénomène symbiotique.

Par « phénomène symbiotique » on entend une relation entre différents types de bactéries lactiques qui sont capables de créer une assistance mutuelle entre elles et d'augmenter leurs activités de fermentation.

Selon un mode de réalisation avantageux, la proportion des bifidobactéries dans les ferments contenus dans le produit alimentaire fermenté tel que défini ci-dessus est d'environ 20 à environ 80 %, notamment d'environ 30 à environ 70 %, notamment d'environ 40 à environ 60 %, et notamment d'environ 50 %.

Par « proportion de bifidobactéries dans les ferments » on entend la proportion des bifidobactéries par rapport au nombre total de bactéries incluses dans le produit

alimentaire fermenté, c'est à dire par rapport à l'ensemble des bifidobactéries et des autres bactéries, notamment les bactéries *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*...

Le bon équilibre numérique entre les bifidobactéries et les autres souches bactériennes dans le produit alimentaire fermenté à l'issue du procédé de préparation, et le maintien substantiel de cet équilibre tout au long de la période de conservation, sont des garants essentiels de la qualité du produit alimentaire.

Une proportion de 50 % de bifidobactéries constitue un bon compromis entre les problématiques de coût (les bifidobactéries coûtent cher) et les problématiques d'obtention d'une population correcte de bifidobactéries.

Selon un mode de réalisation particulier, le produit alimentaire fermenté selon l'invention se présente sous la forme d'un produit alimentaire fermenté brassé ou d'un produit alimentaire fermenté à boire ou d'un produit alimentaire fermenté infantile.

Par « produit [...] brassé » on entend un produit, notamment un lait,ensemencé, fermenté, brassé mécaniquement puis conditionné. La fermentation d'un tel produit ne s'effectue pas en pot mais en vrac, dans des cuves. Le caillé est brassé puis refroidi avant d'être conditionné en pots, qui sont stockés au froid. Par caillé on entend un coagulat de protéines notamment de lait.

Par « produit [...] à boire » on entend un produit sous forme substantiellement liquide. Un produit à boire est un produit qui est tel que, après l'étape de brassage mécanique, le produit est battu dans les cuves avant d'être conditionné.

Par « produit [...] infantile » on entend un produit adapté aux besoins du nourrisson, à faible teneur en protéines et en graisse.

Ledit produit alimentaire fermenté peut notamment être un yaourt ou un yoghourt ferme, brassé ou à boire ou une barre contenant de la matière laitière, du kéfir, un biscuit avec un fourrage laitier, une eau contenant des probiotiques...

Par ailleurs l'invention concerne également un procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté à partir d'une matière de départ, comprenant les étapes successives suivantes :

- une étape d'ensemencement d'une matière de départ, éventuellement pasteurisée, par inoculation de ferments d'ensemencement contenant d'environ 4.10^6 à environ 1.10^7 bifidobactéries par ml de matière de départ, pour obtenir une matièreensemencée,
- une étape de fermentation de la matièreensemencée obtenue à l'étape précédente, telle que la température de début de fermentation est d'environ 36 à

environ 38°C, la température de fin de fermentation est d'environ 37 à environ 39°C, et le temps de fermentation est d'environ 8 à environ 11 heures, pour obtenir une matière fermentée,

- une étape de refroidissement intermédiaire de la matière fermentée obtenue à l'étape précédente, telle que le temps de refroidissement intermédiaire est d'environ 1h30 à environ 2 heures et la température de refroidissement intermédiaire est d'environ 4 à environ 18°C, pour obtenir une matière pré-refroidie,
- une étape de stockage de la matière pré-refroidie obtenue à l'étape précédente, telle que le temps de stockage est inférieur à environ 15 heures, pour obtenir une matière stockée,
- une étape de refroidissement final de la matière stockée obtenue à l'étape précédente, telle que la température de début de refroidissement final est inférieure à environ 21°C et la température de fin de refroidissement final est d'environ 2 à environ 6°C, de manière à obtenir un produit alimentaire fermenté.

Les ferments utilisés pour ensemençer la matière de départ sont généralement obtenus par croissance de bifidobactéries dans un milieu de culture et dans des conditions telles que quand la population de bifidobactéries arrive à confluence, elle contient 10^8 à 10^9 bifidobactéries par ml de milieu de culture. On constate donc que selon l'invention la quantité de ferments utilisée au départ correspond à environ 0,1% de la dose de bifidobactéries classiquement utilisée.

Par « fermentation » on entend une réaction biochimique qui consiste à libérer de l'énergie à partir d'un substrat organique, sous l'action de micro-organismes. Il s'agit d'un procédé de transformation d'une matière première par les micro-organismes, cette transformation produisant alors de la biomasse et des métabolites. En particulier, la fermentation lactique est un processus anaérobie de consommation du lactose par les bactéries des ferments, ce qui provoque la formation d'acide lactique et un abaissement du pH.

L'invention provient de la constatation surprenante effectuée par les inventeurs que le réglage des paramètres de temps, de température et de population initiale de bifidobactéries dans les gammes sus-citées, permet d'améliorer la résistance des bifidobactéries et leur capacité à survivre. Les bifidobactéries contenues dans le produit alimentaire fermenté à l'issue du procédé de préparation de l'invention sont dans un

meilleur état physiologique que si lesdits paramètres sont fixés à des valeurs situées en dehors des gammes ci-dessus, ce qui permet à un plus grand nombre de ces bifidobactéries de survivre au cours de la conservation du produit alimentaire fermenté qui suit.

5 Par ailleurs, le réglage desdits paramètres dans les gammes sus-citées permet des économies substantielles, notamment de temps et d'énergie.

En s'écartant des gammes fixées selon l'invention, le taux de survie des bifidobactéries au cours de la conservation est défavorablement altéré.

10 Le procédé de préparation susmentionné permet l'obtention de produits alimentaires fermentés non fermes.

De façon avantageuse, les ferments contiennent des bactéries lactiques.

Selon un mode de réalisation particulier, le procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'invention est tel que les bifidobactéries sont choisies parmi les bactéries du type *Bifidobacterium animalis*, notamment *Bifidobacterium animalis*
15 *animalis* et / ou *Bifidobacterium animalis lactis*, et / ou *Bifidobacterium breve* et / ou *Bifidobacterium longum* et / ou *Bifidobacterium infantis* et / ou *Bifidobacterium bifidum*.

Selon un mode de réalisation particulier, le procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'invention est tel que les bifidobactéries sont choisies parmi les bactéries du type *Bifidobacterium animalis*.

20 Avantageusement, le temps de refroidissement intermédiaire dans le procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'invention est d'environ 1h30.

Avantageusement, le temps de stockage dans le procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'invention est inférieur ou égal à environ 12 heures, notamment est égal à environ 12 heures.

25 Avantageusement, la température de fin de refroidissement final dans le procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'invention est d'environ 4°C.

Selon un mode de réalisation particulier du procédé de préparation d'un produit alimentaire tel que défini ci-dessus, les ferments d'ensemencement contiennent des bactéries lactiques, en particulier une ou des bactéries du genre *Lactobacillus spp.* et
30 notamment *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* et / ou *Lactobacillus casei* et / ou *Lactobacillus reuteri* et / ou *Lactobacillus acidophilus* et / ou *Lactobacillus helveticus* et / ou *Lactobacillus plantarum*, et / ou des bactéries du type *Lactococcus cremoris* et / ou *Streptococcus thermophilus* et / ou *Lactococcus lactis* et / ou une ou des bactéries du genre *Leuconostoc*.

De façon avantageuse, les bactéries lactiques présentent entre elles un phénomène symbiotique.

Selon un mode de réalisation particulier du procédé de préparation d'un produit alimentaire tel que défini ci-dessus, la proportion des bifidobactéries dans les ferments d'ensemencement est d'environ 20 à environ 75 %, notamment d'environ 30 à environ 50 %, notamment d'environ 35 à environ 40 %, notamment d'environ 37,5 %.

Par « proportion des bifidobactéries dans les ferments d'ensemencement », on entend la proportion des bifidobactéries par rapport à l'ensemble total des bactéries inoculées lors de l'étape d'ensemencement.

Cette proportion correspond à un optimum en terme de coût et de concentration finale de bifidobactéries étant donné que plus la concentration de bifidobactéries est élevée au départ, plus elles emportent la compétition en terme de croissance par rapport aux autres souches des ferments, et plus la concentration optimale de bifidobactéries est atteinte rapidement.

Selon un mode de réalisation particulier du procédé de préparation d'un produit alimentaire tel que défini ci-dessus, la matière de départ est à base de jus végétal et notamment de jus de fruit ou de jus de légume tel que du jus de soja, ou de produit laitier, constitué en particulier de lait de vache et / ou de lait de chèvre.

La matière de départ peut également comprendre du lait de brebis et / ou de chamelle et / ou de jument.

Dans le cas où le produit alimentaire fermenté est un produit laitier, la matière de départ peut comprendre du lait, de la poudre de lait, du sucre, un mélange de lait et de jus végétal, un mélange de lait et de jus de fruit, un mélange de lait et d'amidon.

Selon un mode de réalisation particulier, le procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'invention comporte une étape supplémentaire de brassage entre l'étape de fermentation et l'étape de refroidissement intermédiaire, permettant d'obtenir, à partir de la matière fermentée obtenue à l'étape de fermentation, une matière fermentée brassée.

Par « brassage » on entend un procédé d'agitation mécanique à l'aide d'un brasseur à turbine ou à hélice. Il s'agit d'une étape déterminante pour l'onctuosité du produit notamment laitier. Si le brassage est trop violent, il peut se produire une incorporation d'air et une séparation du sérum. Si le brassage est insuffisant, le produit risque de devenir ultérieurement trop épais.

Selon un mode de réalisation particulier, le procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'invention comporte une étape de pasteurisation avant l'étape d'ensemencement, permettant d'obtenir, à partir de la matière de départ, une matière de départ pasteurisée.

5 Par « pasteurisation » on entend la méthode usuelle dans le domaine de la conservation des aliments consistant en un chauffage rapide sans ébullition, suivi d'un refroidissement brusque, permettant la destruction de la plupart des bactéries tout en conservant partiellement les protéines.

10 Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'invention, la matière de départ pasteurisée est une matière de départ pasteurisée, chambrée, facultativement homogénéisée, et refroidie, obtenue à partir d'une matière brute, ledit procédé comprenant avant l'étape d'ensemencement les étapes successives suivantes :

- 15 – une étape de standardisation en matière grasse de la matière brute de manière à obtenir une matière standardisée,
- une étape d'enrichissement en matière sèche de la matière standardisée obtenue à l'étape précédente, de manière à obtenir une matière enrichie,
- une étape de pré-chauffage de la matière enrichie obtenue à l'étape précédente, de manière à obtenir une matière de départ,
- 20 – une étape de pasteurisation et de chambrage de la matière de départ obtenue à l'étape précédente, de manière à obtenir une matière pasteurisée et chambrée,
- une étape facultative d'homogénéisation de la matière pasteurisée et chambrée obtenue à l'étape précédente, de manière à obtenir une matière
- 25 pasteurisée, chambrée et facultativement homogénéisée,
- une étape de refroidissement initial de la matière pasteurisée, chambrée et facultativement homogénéisée obtenue à l'étape précédente, de manière à obtenir une matière de départ pasteurisée, chambrée, facultativement homogénéisée, et refroidie.

30 Par « standardisation en matière grasse » on entend une étape de mise à niveau pré-déterminé de la quantité de matière grasse présente dans la matière de départ.

L'enrichissement en matière sèche consiste en l'ajout de protéines et de matière grasse pour modifier la fermeté du caillé.

Le chambrage consiste en une thermisation rapide du lait et permet de détruire la flore microbienne végétative, dont les formes pathogènes. Sa durée typique est de 4 à 10 minutes, notamment de 5 à 8 minutes, et notamment d'environ 6 minutes.

Par « homogénéisation » on entend la dispersion de la matière grasse dans la matière de type lait en petits globules gras. L'homogénéisation s'effectue par exemple à une pression de 100 à 280 bars, notamment de 100 à 250 bars, notamment de 100 à 200 bars, notamment d'environ 200 bars. Cette étape d'homogénéisation est purement facultative. Elle est notamment absente dans le processus de production de produits à 0 % de matière grasse.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'invention comprend après l'étape de refroidissement final une étape de conservation du produit alimentaire fermenté à une température comprise entre environ 4 et environ 10 °C.

Selon un mode de réalisation avantageux, le procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'invention comprend une étape d'ajout d'une préparation intermédiaire simultanément à l'étape d'ensemencement ou entre l'étape d'ensemencement et l'étape de fermentation, de manière à obtenir, à partir de la matière ensemencée, une matière ensemencée complétée, ou après l'étape de fermentation, de manière à obtenir, à partir de la matière fermentée, une matière fermentée complétée, ladite préparation intermédiaire comprenant une préparation de fruits et / ou de céréales et / ou des additifs tels que des arômes et colorants.

La préparation intermédiaire peut notamment contenir des épaississants (fibres solubles et insolubles, alginates, carraghénanes, gomme xanthane, pectine, amidon, notamment gélatinisé, gomme gélane, cellulose et ses dérivés, gomme de guar et de caroube, inuline) ou des édulcorants (aspartame, acésulfame K, saccharine, sucralose, cyclamate) ou des conservateurs.

Des exemples d'arômes sont : l'arôme pomme, orange, fraise, kiwi, coco...

Des exemples de colorants sont : le beta carotène, le carmin, le rouge de cochenille.

En outre, la préparation de fruits sus-citée peut comprendre des fruits entiers ou en morceaux ou en gelée ou en confiture, permettant par exemple d'obtenir des yaourts aux fruits.

La préparation intermédiaire peut encore contenir des extraits végétaux (soja, riz...).

L'invention concerne également un produit alimentaire fermenté tel qu'obtenu à partir de l'un des procédés tels que définis ci-dessus.

Brève description des figures

La **figure 1** représente la carte de tolérance correspondant à l'effet de la température de fermentation en fonction de la quantité de bifidobactéries au départ. Abscisse : quantité de bifidobactéries inoculée en 10^7 CFU/ml ; ordonnée : température de fermentation en degrés celsius. Noir : quantité de bifidobactéries inférieure à 5.10^7 CFU/ml ; hachures fines : quantité de bifidobactéries comprise entre 5.10^7 et 10^8 CFU/ml ; hachures épaisses : quantité de bifidobactéries supérieure à 10^8 CFU/ml. La mesure est effectuée en fin de fermentation.

La **figure 2** représente la carte de tolérance correspondant à l'effet de la température de refroidissement des produits avant le stockage final à 10°C en fonction du temps d'attente avant le refroidissement à 20°C . Abscisse : temps d'attente du lissage (en heures) ; ordonnée : température de refroidissement avant le stockage final (en $^{\circ}\text{C}$). Hachures fines : quantité de bifidobactéries comprise entre 5.10^7 et 10^8 CFU/ml ; hachures épaisses : quantité de bifidobactéries supérieure à 10^8 CFU/ml. La mesure est effectuée à 35 jours après la fermentation.

La **figure 3** représente la carte de tolérance correspondant à l'effet de la température de refroidissement des produits avant le stockage final à 10°C en fonction de la température de fermentation. Abscisse : température de fermentation ($^{\circ}\text{C}$) ; ordonnée : température de refroidissement lors du stockage final ($^{\circ}\text{C}$). Noir : quantité de bifidobactéries inférieure à 5.10^7 CFU/ml ; hachures fines : quantité de bifidobactéries comprise entre 5.10^7 et 10^8 CFU/ml ; hachures épaisses : quantité de bifidobactéries supérieure à 10^8 CFU/ml. La mesure est effectuée à 35 jours après la fermentation.

Exemple 1

Afin de prouver que les gammes des différents paramètres telles que définies ci-dessus correspondent à une optimisation vis à vis de la survie des bifidobactéries au cours

de la conservation, on prépare un yaourt brassé standard en faisant varier chaque facteur indépendamment. Chaque facteur est testé à un niveau bas (noté -1), un niveau moyen (noté 0) et un niveau haut (noté +1). La liste des paramètres testés figure dans le tableau 1 ci-dessous :

Tableau 1

	Facteurs	Niveau bas (-1)	Niveau moyen (0)	Niveau haut (+1)
Croissance du bifide	Inoculation de bifidobactéries	10^6 CFU /ml	10^7 CFU /ml	5.10^7 CFU /ml
	Temps de fermentation	6,5 h	8,25 h	10 h
	Température de fermentation	36°C	38°C	40°C
Survie du bifide	Temps d'attente lissage à l'issue de la fermentation	0,33 h	1 h	2,5 h
	Température de refroidissement (lissage)	15°C	17,5°C	20°C
	Temps de stockage tampon après lissage	1 h	12 h	20 h
	Température de conditionnement	15°C	17,5°C	20°C
	Température de refroidissement-stockage des produits	4°C	7°C	10°C

5 A partir des différentes expérimentations, on corrèle les facteurs et on établit des cartes de tolérance vis à vis de la croissance et de la survie des bifidobactéries, qui correspondent aux projections des quantités de bifidobactéries obtenues pour chaque paramètre : voir figures 1 à 3.

10 En particulier sur la figure 2 on constate que si les produits ne sont pas refroidis suffisamment rapidement (temps d'attente en cuve de fermentation trop élevé), il y a une perte de bifidobactéries. Sur la figure 3 on constate que si les produits ne sont pas refroidis correctement entre 4°C et 6°C, la perte en bifidobactéries à J+35 est importante.

Exemple 2

Des essais industriels sont effectués sur 3000 litres.

1^{er} groupe d'essais :

Témoin 1 : température de fermentation 39°C ; temps de stockage 24 h.

5 Témoin 2 : température de fermentation 40°C.

Essai 1 : température de fermentation 37°C, refroidissement 6°C.

(témoin 1 et témoin 2 : lait + poudre de lait)

2^{ème} groupe d'essais :

Témoin 3 : température de fermentation 39°C.

10 Témoin 4 : température de fermentation 40°C.

Essai 2 : tous les paramètres sont choisis dans les gammes revendiquées, c'est à dire :

inoculation de bifidobactéries : 1.10^7 UFC/ml ;

temps de fermentation : 9h40 ;

15 température de fermentation : 37°C ;

temps de refroidissement intermédiaire : 1h30 ;

température de refroidissement intermédiaire : 18°C ;

temps de stockage tampon après lissage : 12 h ;

température de refroidissement final : 6°C.

20 (témoin 3 et témoin 4 : lait + poudre de lait + préparation de fruits ajoutée en fin de fabrication)

Les résultats sont présentés dans les tableaux 2 et 3 ci-dessous, où est indiquée la population de bifidobactéries en CFU/ml.

25 *Tableau 2*

	Fin fermentation	J+1	J+21	J+35
Témoin 1	$1,0.10^8$	$1,0.10^8$	$5,0.10^7$	$3,0.10^7$
Témoin 2	$3,0.10^7$	$6,0.10^7$	$3,0.10^7$	$3,0.10^7$
Essai 1	$1,7.10^8$	$1,7.10^8$	$2,0.10^8$	$1,4.10^8$

Tableau 3

	Fin fermentation	J+1	J+35
Témoin 3	$1,9.10^8$	$1,5.10^8$	$7,0.10^7$
Témoin 4	$2,0.10^7$	$2,0.10^7$	$2,0.10^7$
Essai 2	$5,0.10^8$	$3,8.10^8$	$2,1.10^8$

Dans ces tableaux, J correspond à la fin de la fermentation, J+1 correspond à 1 jour de stockage ...

REVENDICATIONS

1. Produit alimentaire fermenté non ferme contenant des ferments, lesquels contiennent des bactéries lactiques, comportant plus d'environ 5.10^7 , en particulier plus d'environ 10^8 bifidobactéries par gramme de produit alimentaire fermenté pendant une période de conservation d'au moins 30 jours, en particulier d'au moins 35 jours.
2. Produit alimentaire fermenté selon la revendication 1, dans lequel le rapport entre le nombre de bifidobactéries contenues dans le produit alimentaire fermenté à l'issue de la période de conservation et le nombre de bifidobactéries contenues dans le produit alimentaire fermenté au début de la période de conservation d'au moins 30 jours, en particulier d'au moins 35 jours, est d'environ 0,2 à environ 0,8, en particulier d'environ 0,3 à environ 0,7, en particulier d'environ 0,4 à environ 0,5.
3. Produit alimentaire fermenté non ferme conservé pendant une période de conservation d'au moins 30 jours, en particulier d'au moins 35 jours, à une température d'environ 4 à environ 10 °C, contenant des ferments comportant plus d'environ 5.10^7 , en particulier plus d'environ 10^8 bifidobactéries par gramme de produit alimentaire fermenté.
4. Produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 1 à 3, contenant plus d'environ 5.10^7 , en particulier plus d'environ 10^8 bifidobactéries par gramme de produit alimentaire fermenté au début de la période de conservation.
5. Produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 1 à 4, dans lequel les bifidobactéries contenues dans le produit alimentaire fermenté sont du type *Bifidobacterium animalis*, notamment *Bifidobacterium animalis animalis* et / ou *Bifidobacterium animalis lactis*, et / ou *Bifidobacterium breve* et / ou *Bifidobacterium longum* et / ou *Bifidobacterium infantis* et / ou *Bifidobacterium bifidum*.
6. Produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 1 à 5, préparé à base de jus végétal et notamment de jus de fruit ou de jus de légume tel que du jus de soja, ou de produit laitier, et notamment de lait de vache et / ou de lait de chèvre.

7. Produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 1 à 6, dans lequel les ferments contiennent des bactéries lactiques, en particulier une ou des bactéries du genre *Lactobacillus spp.* et notamment *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* et / ou *Lactobacillus casei* et / ou *Lactobacillus reuteri* et / ou *Lactobacillus acidophilus* et / ou *Lactobacillus helveticus* et / ou *Lactobacillus plantarum*, et / ou des bactéries du type *Lactococcus cremoris* et / ou *Streptococcus thermophilus* et / ou *Lactococcus lactis* et / ou une ou des bactéries du genre *Leuconostoc*.

8. Produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel les ferments contiennent des bactéries lactiques qui présentent entre elles un phénomène symbiotique.

9. Produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 1 à 8, dans lequel la proportion des bifidobactéries dans les ferments est d'environ 20 à environ 80 %, notamment d'environ 30 à environ 70 %, notamment d'environ 40 à environ 60 %, et notamment d'environ 50 %.

10. Produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 1 à 9, se présentant sous la forme d'un produit alimentaire fermenté brassé ou d'un produit alimentaire fermenté à boire ou d'un produit alimentaire fermenté infantile.

11. Procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté à partir d'une matière de départ, comprenant les étapes successives suivantes :

- une étape d'ensemencement d'une matière de départ, éventuellement pasteurisée, par inoculation de ferments d'ensemencement contenant d'environ 4.10^6 à environ 1.10^7 bifidobactéries par ml de matière de départ, pour obtenir une matièreensemencée,
- une étape de fermentation de la matièreensemencée obtenue à l'étape précédente, telle que la température de début de fermentation est d'environ 36 à environ 38°C, la température de fin de fermentation est d'environ 37 à environ 39°C, et le temps de fermentation est d'environ 8 à environ 11 heures, pour obtenir une matière fermentée,

- une étape de refroidissement intermédiaire de la matière fermentée obtenue à l'étape précédente, telle que le temps de refroidissement intermédiaire est d'environ 1h30 à environ 2 heures et la température de refroidissement intermédiaire est d'environ 4 à environ 18°C, pour obtenir une matière pré-refroidie,
- une étape de stockage de la matière pré-refroidie obtenue à l'étape précédente, telle que le temps de stockage est inférieur à environ 15 heures, pour obtenir une matière stockée,
- une étape de refroidissement final de la matière stockée obtenue à l'étape précédente, telle que la température de début de refroidissement final est inférieure à environ 21°C et la température de fin de refroidissement final est d'environ 2 à environ 6°C, de manière à obtenir un produit alimentaire fermenté.

12. Procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon la revendication 11, dans lequel les bifidobactéries sont choisies parmi les bactéries du type *Bifidobacterium animalis*, notamment *Bifidobacterium animalis animalis* et / ou *Bifidobacterium animalis lactis*, et / ou *Bifidobacterium breve* et / ou *Bifidobacterium longum* et / ou *Bifidobacterium infantis* et / ou *Bifidobacterium bifidum*.

13. Procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 11 ou 12, dans lequel les bifidobactéries sont choisies parmi les bactéries du type *Bifidobacterium animalis*.

14. Procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 11 à 13, dans lequel le temps de refroidissement intermédiaire est d'environ 1h30.

15. Procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 11 à 14, dans lequel le temps de stockage est inférieur ou égal à environ 12 heures, notamment est égal à environ 12 heures.

16. Procédé selon l'une des revendications 11 à 15, dans lequel la température de fin de refroidissement final est d'environ 4°C.

17. Procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 11 à 16, dans lequel les ferments d'ensemencement contiennent des bactéries lactiques, en particulier une ou des bactéries du genre *Lactobacillus spp.* et notamment *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* et / ou *Lactobacillus casei* et / ou *Lactobacillus reuteri* et / ou *Lactobacillus acidophilus* et / ou *Lactobacillus helveticus* et / ou *Lactobacillus plantarum*, et / ou des bactéries du type *Lactococcus cremoris* et / ou *Streptococcus thermophilus* et / ou *Lactococcus lactis* et / ou une ou des bactéries du genre *Leuconostoc*.

18. Procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 11 à 17, dans lequel la proportion des bifidobactéries dans les ferments d'ensemencement est d'environ 20 à environ 75 %, notamment d'environ 30 à environ 50 %, notamment d'environ 35 à environ 40 %, notamment d'environ 37,5 %.

19. Procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 11 à 18, dans lequel la matière de départ est à base de jus végétal et notamment de jus de fruit ou de jus de légume tel que du jus de soja, ou de produit laitier, constitué en particulier de lait de vache et / ou de lait de chèvre.

20. Procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 11 à 19, comprenant une étape supplémentaire de brassage entre l'étape de fermentation et l'étape de refroidissement intermédiaire, permettant d'obtenir, à partir de la matière fermentée obtenue à l'étape de fermentation, une matière fermentée brassée.

21. Procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 11 à 20, comprenant une étape de pasteurisation avant l'étape d'ensemencement, permettant d'obtenir, à partir de la matière de départ, une matière de départ pasteurisée.

22. Procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 11 à 21, dans lequel la matière de départ pasteurisée est une matière de départ pasteurisée, chambrée, facultativement homogénéisée, et refroidie, obtenue à partir

d'une matière brute, ledit procédé comprenant avant l'étape d'ensemencement les étapes successives suivantes :

- une étape de standardisation en matière grasse de la matière brute de manière à obtenir une matière standardisée,
- une étape d'enrichissement en matière sèche de la matière standardisée obtenue à l'étape précédente, de manière à obtenir une matière enrichie,
- une étape de pré-chauffage de la matière enrichie obtenue à l'étape précédente, de manière à obtenir une matière de départ,
- une étape de pasteurisation et de chambrage de la matière de départ obtenue à l'étape précédente, de manière à obtenir une matière pasteurisée et chambrée,
- une étape facultative d'homogénéisation de la matière pasteurisée et chambrée obtenue à l'étape précédente, de manière à obtenir une matière pasteurisée, chambrée et facultativement homogénéisée,
- une étape de refroidissement initial de la matière pasteurisée, chambrée et facultativement homogénéisée obtenue à l'étape précédente, de manière à obtenir une matière de départ pasteurisée, chambrée, facultativement homogénéisée, et refroidie.

23. Procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 11 à 22, comprenant après l'étape de refroidissement final une étape de conservation du produit alimentaire fermenté à une température comprise entre environ 4 et environ 10 °C.

24. Procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté selon l'une des revendications 11 à 23, comprenant une étape d'ajout d'une préparation intermédiaire simultanément à l'étape d'ensemencement ou entre l'étape d'ensemencement et l'étape de fermentation, de manière à obtenir, à partir de la matièreensemencée, une matièreensemencée complétée, ou après l'étape de fermentation, de manière à obtenir, à partir de la matière fermentée, une matière fermentée complétée, ladite préparation intermédiaire comprenant une préparation de fruits et / ou de céréales et / ou des additifs tels que des arômes et colorants.

25. Produit alimentaire fermenté tel qu'obtenu à partir du procédé de l'une des revendications 11 à 24.