



(22) Date de dépôt/Filing Date: 2006/06/12
(41) Mise à la disp. pub./Open to Public Insp.: 2006/12/14
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2015/04/14
(62) Demande originale/Original Application: 2 611 410
(30) Priorité/Priority: 2005/06/10 (FR0505911)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 1/20* (2006.01),
A23L 1/30 (2006.01), *A23L 2/52* (2006.01),
A23L 2/02 (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
BEVERINI, MARC, FR;
LACORRE, CHRISTELLE, FR;
FRANCOIS, ALAN, FR;
LABBE, MICKAEL, FR

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

(74) Agent: NORTON ROSE FULBRIGHT CANADA
LLP/S.E.N.C.R.L., S.R.L.

(54) Titre : SOUCHE DE LACTOBACILLUS PLANTARUM UTILISEE COMME AGENT PROBIOTIQUE DANS DES
PRODUITS ALIMENTAIRES APPAUVRIS EN ACIDES ORGANIQUES

(54) Title: PRODUIT ALIMENTAIRE ENRICHIS EN PROBIOTIQUE ET APPAUVRI EN ACIDES ORGANIQUES

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne une souche de *Lactobacillus plantarum* déposée le 4 avril 2002 sous le numéro CNCM I-2845 à la Collection Nationale De Cultures de Microorganismes.



Abrégé :

La présente invention concerne une souche de *Lactobacillus plantarum* déposée le 4 avril 2002 sous le numéro CNCM I-2845 à la Collection Nationale De Cultures de Microorganismes.

**SOUCHE DE *LACTOBACILLUS PLANTARUM* UTILISÉE COMME
AGENT PROBIOTIQUE DANS DES PRODUITS ALIMENTAIRES
APPAUVRIS EN ACIDES ORGANIQUES**

5 La présente invention concerne un produit alimentaire à base de fruits, de type
boisson ou purée de fruits, comprenant une concentration en probiotiques vivants, et
stables préférentiellement supérieure à 10^8 UFC/ml, une teneur forte en fruits,
préférentiellement supérieure à 50 % et dont la teneur en acides organiques est
diminuée de 10 à 100%, préférentiellement 30 à 70 %, encore plus préférentiellement
10 60% par rapport à la teneur initiale de la matrice de fruits en acides organiques, ainsi
qu'un procédé de préparation d'un tel produit alimentaire.

L'ingestion de microorganismes vivants appelés probiotiques, dont certaines
souches de bactéries, en particulier celles qui appartiennent au genre *Lactobacillus*
15 sont particulièrement bénéfiques au niveau de la santé. En effet, ils ont fait l'objet de
nombreuses études démontrant des effets cliniques préventifs dans des domaines
variés (par exemple dans les domaines des manifestations allergiques, des diarrhées
infectieuses, des maladies inflammatoires) et sur certaines fonctions physiologiques
(par exemple la digestion du lactose, le transit intestinal, l'immunité). Ces
20 probiotiques sont notamment capables de favoriser un bon fonctionnement de la flore
intestinale qui est susceptible d'intéresser la population générale. En effet, ces
bactéries produisent entre autre des bactériocines et de l'acide lactique qui
augmentent indirectement la digestibilité des aliments, favorisent le péristaltisme
intestinal, et accélèrent l'évacuation des selles. De plus, ces bactéries produisent
25 certaines vitamines du complexe B, et favorisent en général l'absorption des
vitamines et minéraux, diminuent le cholestérol sanguin, renforcent le système
immunitaire et tapissent les muqueuses intestinales afin de protéger contre l'invasion
et les activités des microorganismes nuisibles.

30 De ce fait, depuis plusieurs années, les industries agroalimentaires tentent
d'incorporer de telles bactéries dans leurs produits.

De tels produits additionnés de bactéries sont traditionnellement des produits laitiers mais d'autres produits alimentaires, notamment à base de fruits, sont intéressants à développer pour le marché de l'industrie agroalimentaire.

5 Des produits alimentaires à base de fruits et additionnés de bactéries du genre *Lactobacillus* sont déjà connus dans l'état de la technique, par exemple dans la demande de brevet internationale WO 00/70972, et la demande de brevet européen EP 0113055.

10 Cependant, dans des produits alimentaires à base de fruits additionnés de lactobacilles, on a pu observer une croissance bactérienne qui induit lors du stockage des produits, une altération de leurs qualités par une production de gaz et de faux-goûts qui les rend impropres à la consommation.

De nombreux micro-organismes sont capables de décarboxyler des acides cinnamiques substitués tel que l'acide trans-4-hydroxy-3-methoxy-cinnamique (acide férulique) et l'acide trans-4-hydroxy-cinnamique (acide p-coumarique) pour former respectivement les deux composés volatils suivant : le 3-methoxy-4-hydroxystyrene (4-vinyl guaiacol) et le 4-hydroxystyrene (4-vinyl phénol). Ces molécules sont responsables de faux-goûts de type « phénolique, fumé, gants, médicinal... ». Les activités acide p-coumarique et acide férulique décarboxylases ont été détectées chez
15 les bactéries du genre *Lactobacillus*. En particulier, les Lactobacilles connus pour ces activités sont les suivants : *L. brevis*, *L. crispatus*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. paracasei* (réf biblio : van Beek, S and Priest FG - 2000 - Decarboxylation of substituted cinnamic acids by lactic acid bacteria isolated during malt whisky fermentation - Applied and Environmental Microbiology, 66 (12) :
20 5322-8). Ainsi, via des voies de biotransformation, des souches de lactobacilles sont capables de générer des faux-goûts à partir d'acides phénoliques.

Actuellement, les solutions proposées dans l'état de la technique pour résoudre ce problème de production de gaz et de faux-goûts sont, par exemple dans la demande de brevet internationale WO 00/70972 déposée par la société PROBI, une
30 conservation des produits à une température comprise entre 4 et 8°C et une faible concentration en fruits (25% environ).

Cependant ces solutions ne permettent pas de proposer des produits ayant une concentration supérieure à 50 % en fruits, comprenant en outre des bactéries du genre *Lactobacillus* vivantes et stables à une concentration importante. Ce que l'on entend
5 par concentration importante est une population supérieure ou égale à 10^8 UFC/ml de produit. Par bactéries stables, on entend une population bactérienne à activité métabolique réduite (production de gaz, et/ou de faux-goûts, et acidification lors du stockage limitées et maîtrisées) à froid, c'est-à-dire à une température comprise entre 4 et 10°C. La postacidification (acidification spécifique de la conservation du
10 produit) limitée sera la conséquence d'une part d'une diminution de la concentration des acides organiques présents dans le produit et d'autre part de la basse température de conservation dudit produit.

Un produit alimentaire à base de fruits de type boisson ou purée de fruits et comprenant des probiotiques vivants stables aura comme avantage d'apporter au
15 consommateur les bienfaits des fruits et des probiotiques.

Le Plan National Nutrition Santé préconise la consommation minimum de cinq portions de fruits et légumes par jour. Les observations menées par de nombreux scientifiques montrent que consommer plus de fruits et légumes permet notamment de réduire le taux de cholestérol, les apports lipidiques, et de limiter la prévalence de
20 l'obésité chez les enfants.

Plusieurs études scientifiques suggèrent que les probiotiques peuvent jouer également un rôle de premier plan sur la santé. Chaque souche de probiotique peut offrir des bénéfices santé spécifiques. On peut retrouver parmi ces bénéfices santé : une amélioration du fonctionnement du système digestif et un renforcement des
25 défenses naturelles. Certains probiotiques agissent en absorbant des protéines et d'autres produisent des vitamines. Certains peuvent également produire des composés qui luttent contre la propagation de bactéries pathogènes et peuvent ainsi jouer un rôle dans l'écosystème intestinal.

Il serait souhaitable pour l'industrie agroalimentaire de pouvoir préparer de tels
30 produits alimentaires, et c'est l'objet de la présente invention.

Afin d'augmenter la viabilité des bactéries les demandes de brevet européen EP 0113055 et EP 0166238 déposées par Kirin Beer proposent la réduction sélective de la concentration en polyphénols présents dans les jus de fruits, qui sont des composants bactériostatiques, par contact du jus avec des agents absorbants. Dans ce cas, le but recherché est également de favoriser la fermentation des bactéries et non de maintenir la population initiale stable comme selon la présente invention.

Dans l'état de la technique, il est connu que les fruits contiennent des acides organiques, et les inventeurs ont observé que les bactéries du genre *Lactobacillus* métabolisent ces acides organiques, et que cette métabolisation des acides organiques peut être responsable de la production du gaz carbonique, et/ou des faux-goûts dans les produits alimentaires à base de fruits. Les compositions en acides organiques de certains fruits peuvent être facilement connues en consultant des sources bibliographiques comme par exemple les échelles d'acidité par fruits dans le « code of practice » de l'AIJN.

De nombreuses souches des genres *Leuconostoc*, *Streptococcus* et *Lactobacillus* sont capables de dégrader le malate, le citrate, le pyruvate, le fumarate, le tartrate et le gluconate pour produire du gaz. En comparaison avec la mesure de gaz produit, la détermination des teneurs en diacétyle et en acétoïne est une méthode plus efficace pour détecter la dégradation du pyruvate (Hegazi F.Z., Abo-Elnaga I.G., 1980. Degradation of organic acids by dairy lactic acid bacteria. *Mikrobiologie der Landwirtschaft der Technologie und des Umweltschutzes*, 135 (3), 212.).

Des acides organiques tels que l'acide malique ou l'acide citrique, quand ils sont dégradés, à moins que cette assimilation ne s'accompagne d'une trop grande production d'acétate qui génère lui aussi des faux-goûts, ne posent pas cette problématique justement de génération de goûts désagréables pour le consommateur. Néanmoins, l'assimilation de ces acides organiques par des souches bactériennes produira cette fois du CO₂ qui fera gonfler l'emballage du produit. En effet, ces acides organiques sont naturellement métabolisés par certaines espèces de lactobacilles pour produire du pyruvate (le composé central des cycles métaboliques

tel que le métabolisme carboné) et du CO₂ ; de plus le pyruvate est lui-même sujet à des décarboxylations augmentant d'autant le taux de CO₂ produit.

Certains de ces acides organiques sont des composés phénoliques (acide coumarique, acide ferrulique) et la dégradation de ces composés par les souches bactériennes pourra générer des faux-goûts dans le produit.

Selon le pH du produit fini, le profil sensoriel d'un acide est très variable. Ainsi, l'acide lactique est le plus astringent à pH 3,5 devant l'acide citrique et l'acide malique (Hartwig P., McDaniel M.R., 1995. Flavor characteristics of lactic, malic, citric and acetic acids at various pH levels. *Journal of Food Science*, 60 (2), 384-388.).

La figure 1 représente ainsi le mécanisme de métabolisation de l'acide malique (ou malate), de l'acide citrique (ou citrate) et du pyruvate.

Il existe des boissons commerciales, notamment le produit ProViva distribué par Skanemejerier, contenant une souche du genre *Lactobacillus* à une teneur au maximum égale à 10⁸ UFC/mL et à pH acide (pH=3,8). La stabilité du produit n'est cependant garantie que grâce à une conservation à 4°C et à une faible teneur en jus de fruits (<25%). De plus, les produits commerciaux ProViva ont ciblé certains types de fruits à teneurs faibles en acides organiques et ne comprennent pas des jus importants comme les jus d'orange, les jus de pomme et les jus multifruits exotiques.

Les inventeurs ont montré qu'un appauvrissement en acides organiques de la matrice de fruits à la base du produit alimentaire permet de réduire ou d'éliminer la production du gaz carbonique, et/ou des faux-goûts dans le produit alimentaire final, après conditionnement tout en préservant les qualités nutritionnelles du produit, quelque soit les fruits, la concentration en fruits et la concentration en acides organiques du produit final. Ainsi, les inventeurs proposent de contrôler et de recommander une teneur limitante en acides organiques qui doit être ajustée à la teneur cible en matrice de fruits dans la formule et au type de fruit considéré.

Un objet de la présente invention est donc un produit alimentaire conditionné à base de fruits comprenant des probiotiques vivants stables et dont la teneur en acides

organiques est diminuée de 10 à 100%, préférentiellement 30 à 70 %, encore plus préférentiellement 60% par rapport à la teneur initiale de la matrice de fruits en acides organiques et dans lequel la production de faux goûts est réduite ou éliminée par rapport à la matrice de fruits initiale.

5

Par probiotique, on entend désigner des microorganismes vivants qui, lorsqu'ils sont intégrés en quantité suffisante, exercent un effet positif sur la santé au-delà des effets nutritionnels traditionnels.

10 Par probiotiques vivants, on entend désigner, selon la présente invention, des probiotiques dont le taux de survie après 28 jours dans un produit alimentaire selon la présente invention est supérieur à 60% et avantageusement supérieur à 80%.

15 La viabilité des probiotiques est mesurée par des techniques de numération connue de l'homme du métier comme par exemple la numération en masse, la numération en surface, les cellules de Malassez, le comptage direct, la turbidité, la néphélométrie, le comptage électronique, la cytométrie en flux, la fluorescence, l'impédancemétrie, l'analyse d'images.

20 Par probiotiques stables, on entend désigner, selon la présente invention, des probiotiques ayant une absence d'activité pendant au moins 30 jours à 10°C. L'absence d'activité se traduit par :

- Une absence de détection de production de gaz (CO₂ par exemple) lors de la conservation en emballage
- 25 • Une qualité organoleptique constante sans altération des qualités initiales de la matrice de fruits et sans production de faux goût.
- Une absence de post-acidification importante (baisse de pH < 0,5 unité).
- Une non-prolifération des probiotiques et un maintien de la population
- 30 initiale (+/- 50%).

En particulier, ces probiotiques peuvent être des bactéries.

Par bactéries, on entend désigner préférentiellement selon la présente invention des bactéries lactiques, du genre *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactococcus spp.*, *Leuconostoc spp.* et en particulier *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*,
5 *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*.

Plus particulièrement, les bactéries préférées selon la présente invention sont les bactéries ayant la capacité de dégrader les acides organiques en CO₂ et/ou en
10 composés générant des faux goûts.

Plus particulièrement, les souches bactériennes préférées selon la présente invention sont du genre *Lactobacillus*, préférentiellement *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus casei* et encore plus préférentiellement les souches *Lactobacillus plantarum* déposées le 16/03/95 sous le numéro DSM 9843 à la Deutsche Sammlung
15 von Mikroorganismen von Zellkulturen GmbH ou des souches de *Lactobacillus plantarum* déposées le 4/04/02 sous le numéro CNCM I-2845 à la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes.

La souche *Lactobacillus Plantarum* déposée le 16/03/95 sous le numéro DSM
20 9843 à la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen von Zellkulturen GmbH est commercialisée par la société PROBI, sous le nom *Lactobacillus plantarum* 299v®. Cette souche possède de nombreux avantages pour une utilisation en tant que probiotique dans un produit alimentaire à base de fruits :

25

- Elle répond aux critères probiotiques fixés par la communauté scientifique.
- Elle est brevetée, caractérisée (RAPD, ribotypage) et sa classification est confirmée ;
- 30 • Elle est GRAS (de l'anglais "Generally Recognized As Safe") ;

- Elle est déjà présente à un taux de 10^8 UFC/ml dans le produit ProViva® distribué par Skanemejerier et est consommée depuis 1994 ;
- Elle présente une très bonne survie à pH acide inférieur à 4;
- 5 • Elle est amylase négative donc ne dégrade pas la texture du produit fini.

Cependant, cette souche a aussi plusieurs inconvénients :

- Elle présente un fort potentiel de post acidification
- 10 • Elle engendre des défauts organoleptiques importants liés à la synthèse d'acide acétique.
- Elle dégrade l'acide citrique (e.g jus de citron, jus d'orange) ou l'acide malique (e.g jus de pomme ou de poire) avec production de gaz carbonique d'où des problèmes de gonflement possibles notamment si
- 15 la chaîne du froid est rompue (c'est à dire dépassement de la température de 8°C).

Cette souche présente donc de nombreux points positifs mais son utilisation dans le cadre de produits alimentaires à base de fruits ne peut pas se faire telle quelle, sans appauvrissement en acides organiques de la matrice de fruits à la base du produit alimentaire.

Il en est de même pour la souche de *Lactobacillus plantarum* déposée le 4/04/02 sous le numéro CNCM I-2845 à la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes.

25

Par matrice de fruits, on entend désigner selon la présente invention un jus de fruits, un jus de fruits reconstitué à base de concentré, ou une purée de fruits, sans probiotiques, non appauvrie en acides organiques, mais comprenant de manière optionnelle d'autres substances telles que par exemple, du sucre, de l'eau, des arômes, des colorants, des édulcorants, des agents anti-oxygène, du lait, des conservateurs, des acidifiants, des agents de texture, des protéines d'origine animale

30

(protéines de lait, de lactosérum...) ou végétale (soja, riz...) ou des extraits de végétaux (soja, riz...).

Par faux goûts, on entend un goût anormal pour le produit alimentaire. Un faux-goût est désagréable pour le consommateur donc non-recherché. Ainsi, à titre
5 d'exemple on peut citer pour les produit alimentaire selon la présente invention le faux-goût de type « terreux-foin » via la fermentation et l'oxydation du produit, de type « vinaigre » via le ferment à partir d'acides organiques présent dans le produit, et de type « rance » via la présence d'acides gras volatiles.

10 Des notes dites « positives » peuvent également être détectées dans le produit, telles que par exemple des notes de type « orange » ou « fruitée ». Ces goûts n'étant pas désagréables pour le consommateur, ils ne sont pas compris dans les « faux-goûts » selon la présente invention.

La teneur en molécules responsables de "faux-goûts" est mesurée par micro-
15 extraction en phase solide (SPME) associée à un chromatographe en phase gazeuse (CPG)couplé à un spectromètre de masse (SM). Cette méthode a été développée spécifiquement et possède une sensibilité accrue tout en ayant une bonne reproductibilité et une bonne répétabilité. La SPME permet une concentration spécifique des molécules volatiles cibles pour une meilleure quantification et une
20 meilleure identification. La CPG permet la séparation des molécules volatiles selon leur polarité et leur masse molaire et ainsi obtenir des pics correspondants à chaque molécule. La teneur de chaque molécule est exprimée en aire de pic c'est à dire en unité d'absorbance (UA) proportionnelle à leur concentration dans l'échantillon. Enfin, le spectromètre de masse permet d'une part une identification certaine de
25 chaque molécule via leur fragmentation en ions caractéristiques et d'autre part une deuxième quantification des molécules volatiles où la teneur est cette fois exprimée en unité de masse.

30 Par arômes on entend désigner des ingrédients destinés à donner une saveur (c'est à dire un goût et/ou une odeur) à une denrée alimentaire.

Les arômes sont utilisés dans deux buts technologiques principaux :

- soit ils renforcent la flaveur naturelle du produit alimentaire, ou la restituent partiellement si elle est trop faible (produits ayant perdu une partie de leur goût au cours du procédé de fabrication),
- soit ils remplacent un ingrédient apportant une note aromatique au produit fini (ex : yaourt arôme fraise).

Selon la présente invention, les arômes préférés sont : Pomme, orange, fruits rouges, fraise, pêche, abricot, prune, framboise, mure, groseille, citron, agrume, pamplemousse, banane, ananas, kiwi, poire, cerise, noix de coco, fruits de la passion, mangue, figue, rhubarbe, melon, multifruits, fruits exotiques, vanille, chocolat, café, cappuccino.

Par colorants on entend des substances capables de rendre au produit alimentaire, de renforcer ou de conférer une coloration.

Selon la présente invention, les colorants préférés sont : le bêta carotène, le carmin.

Par édulcorant, on entend des substances capables de mimer le pouvoir sucrant du sucre sans pour autant apporter les calories du sucre.

Selon la présente invention, les édulcorants préférés sont : aspartame, acésulfame K, saccharine, sucralose et cyclamate.

Par agents anti-oxygène, on entend des substances capables d'éviter ou de réduire les phénomènes d'oxydation qui provoquent entre autres le rancissement des matières grasses ou le brunissement des fruits et légumes coupés.

Selon la présente invention, les agents anti-oxygène préférés sont : vitamine C, vitamine E, extrait de romarin.

Par lait on entend le lait d'origine animale (par exemple vache, chèvre, brebis) ou des jus d'origine végétale (par exemple jus extrait de soja, tonyu, riz, avoine, quinoa, châtaigne, amande ou noisette).

Par conservateurs on entend des substances destinées à aider à la conservation en empêchant la présence et le développement de microorganismes indésirables (par exemple : moisissures ou bactéries responsables d'intoxications alimentaires) dans le produit alimentaire final.

- 5 Selon la présente invention, les conservateurs préférés sont l'acide sorbique, l'acide ascorbique, et l'anhydride sulfureux.

Par agents de texture on entend des substances qui permettent d'améliorer la présentation ou la tenue du produit alimentaire final. Les agents de texture peuvent être des émulsifiants, des stabilisants, des épaississants, ou des gélifiants. Ils peuvent
10 être utilisés dans le produit alimentaire selon la présente invention seuls ou en combinaison.

Selon la présente invention, les agents de texture préférés sont : la pectine, utilisé comme gélifiant, la graine de caroube, les carraghénanes, les alginates, la gomme guar, la gomme de xanthane, l'amidon, les mono et diglycérides d'acides gras
15 alimentaires.

Par acidifiants on entend préférentiellement l'acide lactique et/ou l'acide citrique et/ou l'acide ortho-phosphorique.

20 Par eau, on entend de manière optionnelle l'eau osmosée. L'eau osmosée permet de limiter la quantité de minéraux présents dans le produit final, les minéraux pouvant être responsables également de faux-goûts.

Le potassium, le chlore, le magnésium et le calcium sont en effet plutôt amers sous différentes formes (KCl, NH₄Cl, CaCl₂, acétate de Ca, LiCl, MgSO₄...) alors
25 que le sodium, le lithium et le sulfate sont plutôt salé et/ou acide selon la forme sous laquelle ils sont (forme salée : NaCl, Na₂SO₄, tartrate de Na ; forme acide : Na₂NO₃, acétate de Li ; forme salée et acide : acétate de Na, ascorbate de Na, citrate de Na). Outre ces effets directs sur les qualités sensorielles des produits, ces composés peuvent également avoir un effet « salting out » sur les molécules volatiles
30 responsables de faux goûts de type « fumé, phénolique... » en favorisant leur passage

dans la phase vapeur au dessus du produit, augmentant ainsi l'intensité des faux-goûts perçues.

Par acides organiques, on entend désigner, selon la présente invention, notamment l'acide malique, l'acide citrique, l'acide tartrique, l'acide pyruvique, l'acide fumarique, ou l'acide gluconique.

De manière préférentielle, les acides organiques dont la teneur est diminuée ou éliminée par rapport à la teneur initiale de la matrice de fruits sont les acides malique et/ou citrique.

La teneur initiale de la matrice de fruits en acides organiques peut être connue par des sources bibliographiques. Dans le cas où la matrice de fruits est un jus de fruit ou un jus de fruits reconstitué à base de concentré, les sources bibliographiques portent sur la concentration en acides organique des jus de fruits. De telles sources sont par exemple les tableaux extrait du code of practice on absolute quality requirement for juices de l'AIJN tel que celui présenté ci après :

15

Tableau 1 : extrait du code of practice on absolute quality requirement for juices de l'AIJN présentant la concentration en acides organique des jus de fruits

	Acide citrique (g/L)	Acide L-malique (g/L)
orange	6.7-17	0.8-3
Pamplemousse	8-20	0.2-1.2
Pomme	50-200	min. 3
raisin	Max 0.5	2.5-7
Ananas	3-11	1.0-4.0
Citron	45-63	1.0-7.5
Fruit de la passion	25-50	1.3-5.0
Poire	max. 4	0.8-5
abricot	1.5-16	5-20
cassis	26-42	1-4
griotte	Max 0.4	15.5-27
framboise	9-22	0.2-1.2

fraise	5-11	0.6-5
pêche	1.5-5	2-6
mandarine	6-22	0.5-3

Dans le cas où la matrice de fruit n'est pas un jus de fruit ou un jus de fruits reconstitué à base de concentré, les sources bibliographiques portent sur la concentration en acides organique des fruits. De telles sources sont par « La composition des aliments : tableaux des valeurs nutritives. 2000 (6ème Edition); SOUCI S.W.; FACHMANN W.; KRAUT H.; SCHERZ H. » dont un exemple de tableau est reproduit ci après :

Tableau 2 : concentration en acides organique des fruits

fruit	acide citrique (mg/100g)			acide malique (mg/100g)		
	moyenne	mini	max	moyenne	mini	max
poire	140	80	200	170	100	240
fraise	748	670	940	303	90	340
pêche	240	160	320	330	280	370
ananas	630	580	670	94	87	100
raisin	23			327	220	650
pomme	29	9	30	426	270	790
abricot	400	140	700	1000	700	1300
orange	1042	600	1880	89	40	190
banane	201	80	390	360	240	500
mangue	264	200	327	74		
griotte	4,7			1800		
cerise (sweet)	13	10	15	940	730	1110
prune	34	23	55	1220	820	1990
pruneau	158			5690		
mûre	18	15	21	900	860	950
myrtille	523			850		
framboise	1720	1060	2480	400	0	800
pamplemousse	1296	1000	1460	180	50	310
goyave	537	532	541	325	182	469
kiwi	995	980	1010	500	470	530
passion	3250			650		
papaye	54	29	100	29	27	31
citron	4683	3500	7200	200		
coing				930		
baie d'églantier				3100		
litchi	16			239		
grenade	500			100		
melon	75	0	150	-	0	50

5 Dans les deux cas, la valeur du tableau utilisée pour déterminer la teneur initiale du jus de fruit ou des fruits en acides organiques est la valeur minimale.

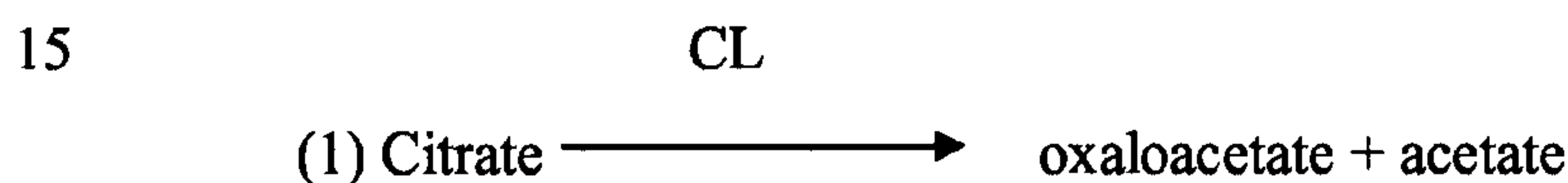
En outre, la teneur initiale de la matrice de fruits en acides organiques peut être définie par tout méthode de quantification appropriée.

De telles méthodes sont par exemple

- 10
- la mesure de l'acidité titrable, qui quantifie la teneur en acides présents dans la matrice de fruits. Elle consiste à neutraliser un échantillon de la matrice de fruits par une solution de soude à 0,1 N, la quantité de soude nécessaire pour atteindre un pH 8 permettant de déduire la valeur d'acidité totale.

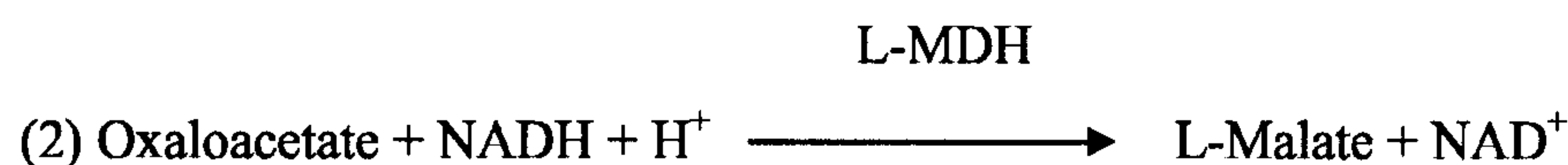
- Le dosage chromatographique par l'HPAEC (High Performance Anion Exchange Chromatography (méthode Dionex : 164-166 avenue Joseph Kessel 78960 Voisins Le Bretonneux France) couplée à une détection conductimétrique.
- 5
- les acides malique et citrique peuvent être dosés par méthodes enzymatiques ; les méthodes de référence sont préconisées par l'International Federation of Fruit Juice Producers (IFU) (ces références sont établies depuis 1985) : IFU 21 pour l'acide malique et IFU22 pour l'acide citrique ; Il s'agit de méthodes spectrophotométriques qui font
- 10
- intervenir des réactions enzymatiques.

La méthode IFU 21 fonctionne sur le principe suivant : l'acide citrique (citrates) présent dans la matrice de fruits initialement est converti en oxaloacetate et acetate dans la réaction catalysée par l'enzyme citrate lyase (CL) (1).



En présence des enzymes L-malate dehydrogenase et L-lactate dehydrogenase, l'oxaloacetate et le pyruvate produit par décarboxylation sont réduits en L-malate et L-lactate, respectivement, par Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NADH) (2) (3)

20

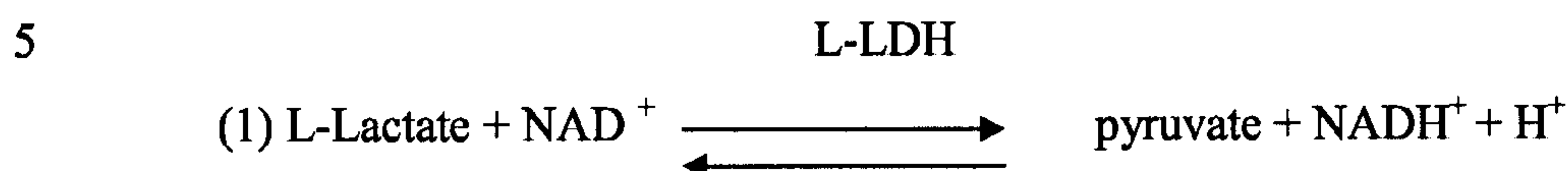


La quantité de NADH oxydé dans les réactions (2) et (3) est stoechiométrique avec la quantité de citrate. NADH est déterminé par la mesure de son absorbance de la lumière à 334, 340 ou 365 nm. Cette mesure permet de déterminer la quantité

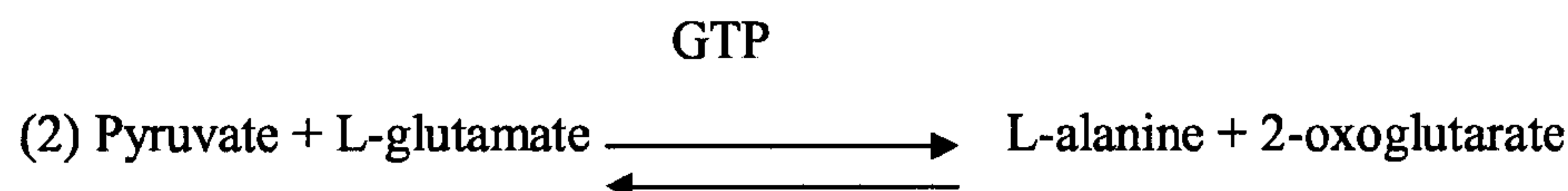
30

d'acide citrique présent initialement dans la matrice de fruits.

La méthode IFU 22 fonctionne sur le principe suivant : l'acide L-lactique (L-lactate) présent dans la matrice de fruits initialement est oxydé en pyruvate par Nicotinamide Adénine Dinucléotide (NAD) en présence de L-lactate dehydrogenase (L-LDH) (1).



L'équilibre de cette réaction repose du côté du L-Lactate. En piégeant le pyruvate dans une réaction ultérieure catalysée par l'enzyme glutamate-pyruvate-transaminase (GPT) en présence de L-glutamate, l'équilibre peut être déplacé en faveur du pyruvate et de NADH (2).



15 La quantité de NADH formé dans la réaction précédente est stoechiométrique avec la quantité d'acide L-lactique. L'augmentation de NADH est déterminée par la mesure de son absorbance de la lumière à 334, 340 ou 365 nm. Cette mesure permet de déterminer la quantité d'acide L-lactique présent initialement dans la matrice de fruits.

20

Selon un premier aspect de présente invention, le produit alimentaire peut être une boisson, préférentiellement à base de jus de fruits ou de jus de fruits reconstitués à base de concentré.

25 Selon la présente invention, on peut citer comme jus de fruits des jus d'orange et notamment le NFC (de l'anglais « Not From Concentrate ») 10-12° Brix et comme jus d'orange reconstitué à base de concentré le FCOJ (de l'anglais « Frozen Concentrate Orange Juice ») à 66° Brix et les autres jus de fruits concentrés entre 10 et 70° Brix.

30 Selon la présente invention, le produit alimentaire comprend entre 20 et 99,99% de jus de fruits, préférentiellement entre 50 et 99,99% de jus de fruits.

Selon un deuxième aspect de la présente invention, le produit alimentaire peut être une purée à base de fruits comprenant préférentiellement entre 50 et 99,99% de purée de fruits et encore plus préférentiellement entre 90 et 99,99% de purée de fruits.

5 Selon la présente invention, les probiotiques sont à une concentration comprise entre $5 \cdot 10^5$ et $1 \cdot 10^9$ UFC/ml, et préférentiellement à une concentration supérieure ou égale à 10^8 UFC/ml. De manière préférée entre toute la concentration est de $4 \cdot 10^7$ UFC/ml

Selon la présente invention, le produit alimentaire a un pH compris entre 3 et 4.

10 Selon la présente invention, le produit alimentaire se conserve, et peut donc être consommé, pendant au moins 30 jours à une température d'au plus 10°C , sans nécessiter l'adjonction d'agents bactériostatiques.

Selon la présente invention, le produit alimentaire est à base d'un fruit.

Selon la présente invention, le produit alimentaire est à base de plusieurs fruits.

15 Selon la présente invention le ou les fruit(s) sont riches en acides organiques.

Selon la présente invention, les fruits sont : orange, citron, raisin, ananas, pomme, poire, pêche et/ou fruits rouges.

De manière préférentielle, le produit alimentaire comprend selon la présente invention du lait et/ou jus végétal.

20 De manière préférentielle, le jus végétal sera un jus réalisé à partir de graines de soja (jus extrait de soja et/ou tonyu).

Selon la présente invention, les acides organiques préférentiellement éliminés de la matrice de fruits sont l'acide malique, l'acide citrique, l'acide tartrique, l'acide pyruvique, l'acide fumarique, l'acide gluconique, l'acide p. coumarique et/ou l'acide
25 caféique.

Un deuxième objet de la présente invention est un procédé de préparation d'un produit alimentaire selon la présente invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- a) Appauvrissement en acides organiques d'une matrice à base de fruits
- 30 b) Ajout de probiotiques à la matrice obtenue après l'étape a)
- c) Conditionnement du produit obtenu après l'étape b).

Selon la présente invention, l'étape a) d'appauvrissement en acides organiques d'une matrice à base de fruits est réalisée par sélection d'une matrice de fruits à faible acidité naturelle.

5 Par matrice de fruits à faible acidité naturelle on entend désigner selon la présente invention une matrice de fruits à partir de laquelle on obtient un jus naturellement faiblement acide qui a son acidité comprise entre la valeur basse indiquée sur le « Code of Practice » de l'AIJN, (The Association of the Industry of Juice and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Union) reconnue par tous les professionnels dans le domaine des jus de fruits et -50% de cette valeur.

10 Les acidités naturelles dépendent non seulement du fruit, mais aussi de sa variété, du climat, du moment de la récolte. De ce fait, des échelles d'acidité par fruit sont définies et les valeurs sont présentées dans le tableau ci-dessous : (source : AIJN) :

Tableau 3 : échelle d'acidité des fruits selon l'AIJN

Fruits	Acidité titrable (exprimée en g d'acide citrique anhydre par litre de jus, mesuré à pH 8.1)
Orange	5-15
Pamplemousse	7,7-18,5
Pomme	2,2-7,5
Raisin	4-11
Ananas	3,2-11,5
Citron	44,8-62
Fruit de la Passion	25,6-50
Poire	1,4-7 g/kg
Abricot	6,4-19,2 g/kg
Cassis	26,7-40,1
Cerise aigre	12,8-22,6
Framboise	12,2-20
Fraise	5,1-11,5
Pêche	3,2-8 g/kg
Banane	2-3,8
Mandarine	5,8-19,2

Pour l'orange, les variétés trouvées en faible acidité naturelle peuvent être à 3 en acidité par exemple (soit 40% en dessous de la valeur basse de l'échelle).

Selon la présente invention la sélection d'une matrice de fruits à faible acidité
5 naturelle est réalisée par sélection variétale des fruits et/ou contrôle de la maturité des fruits.

Les fruits seront sélectionnés de manière préférentielle dès qu'ils auront atteint une maturité tardive.

Selon la présente invention l'étape a) d'appauvrissement en acides organiques
10 d'une matrice à base de fruits est réalisée par déacidification de la matrice de fruits.

Selon la présente invention la déacidification (diminution de l'acidité titrable) de la matrice de fruits est réalisée par électrodialyse de la matrice de fruits, précipitation des acides organiques de la matrice de fruits par des sels de calcium,
15 fermentation malolactique, assimilation sélective de l'acide citrique, et/ou passage de la matrice de fruits sur une résine échangeuse d'anions.

La fermentation citrique aboutit à la production de diacétyl-acétoïne par les bactéries lactiques

De manière préférée, la désacidification de la matrice de fruits selon la présente
20 invention est réalisée par électrodialyse et/ou passage sur résine échangeuse d'anions.

En effet, une résine échangeuse d'anions est idéale pour capter des composés qui ont des radicaux acides COOH puisque ces radicaux se séparent facilement en COO⁻ (anion) et H⁺ (cation), et convient donc pour capter des acides organiques.

Les résines échangeuses d'anions utilisées peuvent être par exemple les résines
25 Dowex®1 fournie par Dow Chemical, USA et Amberlite® IRA-402 fournie par Rohm et Haas Co., USA

Selon la présente invention, les probiotiques sont incorporés en différenciation retardée, c'est-à-dire en fin de ligne de production et juste avant ou pendant l'étape de conditionnement.

30 De plus, l'étape b) et l'étape c) selon la présente invention peuvent être réalisées simultanément. Dans ce cas de figure, le procédé selon la présente invention

possède seulement deux étapes pour éviter les altérations du produit alimentaire final lors de sa conservation, sans prolifération de microorganismes.

Dans un mode préférentiel, une étape d'ajout d'acide lactique sera effectuée entre ou simultanément à l'étape b) et l'étape c) dudit procédé. La quantité d'acide lactique à ajouter sera déterminée facilement par l'homme du métier en fonction de la souche de bactérie qu'il souhaite mettre en oeuvre.

Légende des figures :

Figure 1 : Schéma métabolique d'assimilation du citrate et du malate, et de la production d'acétate chez les bactéries lactiques.

Exemples

EXEMPLE 1 : Formation de gaz par les souches *L. plantarum* DSM 9843 et *L. plantarum* I-2845 (déposée à la CNCM le 4/04/02) en fonction du jus de fruits inoculé.

I Matériel et Méthodes :

I.1. Préparation des suspensions bactériennes et inoculation des jus de fruits

Une première préculture de 2 mL avec les souches DSM 9844 et I-2845 est réalisée. Cette préculture sert à ensemercer à 1% 100 mL de MRS neutre (soit 10^8 - 10^9 ufc/mL). A partir de cette deuxième préculture 3x 1 000 mL en MRS neutre (soit 10^8 - 10^9 ufc/mL) sont encemencés.

Pour chaque souche les centrifugations (Beckman JA-25TM, rotor JA-10TM) sont réalisées avec les pots de 500 mL de la façon suivante :

- remplissage de 6 pots avec 330 mL de culture
- centrifugation de 10 min, 12 000 g, 20°C
- élimination du surnageant et addition de 165 mL de culture
- centrifugation de 10 min, 12 000 g, 20°C
- élimination du surnageant

Chaque culot obtenu est ensuite repris séparément dans le jus de fruit à tester et la suspension obtenue est remise dans la brique de jus de fruit qui est soigneusement refermée ensuite.

5 *I.2. Dosages des acides organiques.*

La technique retenue consiste à séparer les acides organiques par chromatographie d'échanges d'anions haute performance (HPAEC). La détection des acides organiques est réalisée par conductimétrie suppressive (SCD).

10 Le système chromatographique utilisé est de marque DIONEX (type DX600) comprenant un système de détection par conductimétrie suppressive. La cellule de conductimétrie thermostatée (type DS3) est couplée à un système d'auto-suppression externe ASRS-ULTRA (4mm). Ce suppresseur électrolytique a été utilisé avec un mode de recirculation d'eau Milli-QTM à contre-courant, à un débit de 4 mL/min (pression de 15 psi environ).

15 Une colonne d'échange d'anions de type AS11-HC (4mm) est associée à une colonne de garde de type AG11-HC. Le débit d'élution est de 1,5 mL/min.

II Résultats :

II.1. Numérations bactériennes

20 Des numérations bactériennes sont réalisées lors de la conservation des produits afin d'évaluer la survie de *L. plantarum* dans les matrices jus de fruits.

Tableau 4 : Numérations bactériennes de *L. plantarum* lors de la conservation à 10°C des matrices jus de fruits.

Souche	Temps (j)	Orange	Pomme	Raisin
DSM 9843	J0	1,8.10 ⁹ ufc/mL	1,7.10 ⁹ ufc/mL	9,5.10 ⁸ ufc/mL
	J5	5,0.10 ⁹ ufc/mL	5,8.10 ⁸ ufc/mL	4,1.10 ⁹ ufc/mL
I-2845	J0	1,1.10 ⁹ ufc/mL	9,8.10 ⁸ ufc/mL	6,0.10 ⁸ ufc/mL
	J5	4,5.10 ⁹ ufc/mL	1,6.10 ⁹ ufc/mL	3,9.10 ⁹ ufc/mL

25

II.2. Mise en évidence de la consommation d'acides organiques lors du stockage.

Les dosages des acides organiques ont été réalisés à 0 et 5 jours au même moment que les numérations et les résultats sont synthétisés dans le tableau 4.

Tableau 5 : Métabolites produits et acides organiques consommés lors de la conservation à 10°C de jus de fruit contenant *L. plantarum*.

		Lots	Gonflement de la bouteille	pH	Lactate produit	Acétate produit	Malate consommé	Citrate consommé
					mmol	mmol	mmol	mmol
Jus de pomme	Témoin	J0	-	3,43	0,00	0,00	0,00	0,00
	+ DSM 9843	J5	++	3,38	27,93	4,44	6,72	0,21
	+ I-2845	J5	++	3,39	40,86	4,38	21,20	0,19
Jus d'orange	Témoin	J0	-	3,34	0,00	0,00	0,00	0,00
	+ DSM 9843	J5	+++	3,26	53,79	25,78	11,99	4,91
	+ I-2845	J5	++	3,27	48,90	15,60	13,26	1,42
Jus de raisin	Témoin	J0	-	3,22	0,00	0,00	0,00	0,00
	+ DSM 9843	J5	++	3,23	40,79	10,38	23,50	2,09
	+ I-2845	J5	+++	3,24	44,59	8,16	33,87	1,43

D'après les résultats présentés dans le tableau 5, il apparaît clairement que l'acide malique est le substrat le plus consommé par *L. plantarum* quelle que soit la souche considérée. Cette consommation s'accompagne non seulement de productions de lactate et d'actétate et donc d'une baisse sensible du pH (notamment dans les jus

d'orange et de pomme) mais aussi d'une production de gaz ayant un effet macroscopique sur l'emballage.

Selon les voies métaboliques présentées sur la figure 1, l'absence de détection de formiate produit (pas d'action de la pyruvate formiate lyase), la très faible teneur en pentoses des jus de fruits traités, le bilan de production de CO₂ (exprimé en moles) suivant peut être proposé :

$$\text{CO}_2 \text{ total} = \text{malate consommé} + \text{citrate consommé} + (\text{acétate total produit} - \text{acétate issu du citrate})$$

Soit, en remplaçant l'acétate produit à partir du citrate par la quantité de citrate consommé :

$$\text{CO}_2 \text{ total} = \text{malate consommé} + \text{acétate total produit}$$

Conclusion :

L'acide malique et, dans une moindre mesure, l'acide citrique contribuent donc fortement à la production de gaz lors de la conservation à 10°C de jus de fruits contenant une dose élevée (> 1.10⁹ ufc/mL) de bactérie *L. plantarum* DSM 9843 ou I-2845.

EXEMPLE 2 : dilution des jus d'oranges pour définir les taux limites en acides organiques compatibles avec le *L. plantarum* en fonction du pourcentage de jus dans la formule.

Nous avons pratiqué des dilutions à 5, 10, 20, 30% des jus d'oranges, ces dilutions correspondant à des taux de déacidifications de 95, 90, 80 et 70%.

Tableau 6

% de jus dans le produit	% de déacidification	pH	Observation de gonflement ?
30%	70%	pH naturel	Gonflement à J+3
30%	70%	3,7	Gonflement à J+5
20%	80%	pH naturel	Léger gonflement à J+14
20%	80%	3,7	Très faible gonflement
10%	90%	pH naturel	Non
10%	90%	3,7	Non
5%	95%	pH naturel	Non
5%	95%	3,7	Non

- 5 Pour qu'une boisson à base de jus d'orange contenant *L. plantarum* soit stable plus de 30 jours après sa fabrication, nous avons déterminé qu'il fallait qu'elle ait les caractéristiques suivantes :

Tableau 7 :

% de jus d'orange dans la boisson	Acidité du jus d'orange	Ratio Brix / acidité
100	0,4-0,6	100-150
75	1,3-1,45	41-46
50	2,2-2,3	27-30

- 10 Remarques :

- le « rapport Brix/acide » désigne le rapport de la valeur Brix du jus au nombre de grammes d'acide citrique anhydre par 100 grammes de jus ; (*Brix/acid ratio*).

- la « valeur Brix » désigne la teneur en sucre déterminée par réfractométrie, à laquelle la correction pour l'acidité est ajoutée, selon la méthode de *l'Association*

- 15 *of Official Analytical Chemist* des Etats-Unis, intitulée *Solids (Soluble) in Fruit*

Products, publiée dans *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist* 14^e édition, 1984. (*Brix content*) DORS/88-8, art.2 ; DORS/95-548, art.2 ; DORS/2000-184, art.27 ; DORS/2003-6, art.65 (F).

5 **EXEMPLE 3** : Analyse sensorielle de différents produits :

Suite aux problèmes techniques de mise en œuvre de la souche DSM 9843 dans des milieux végétaux (production de CO₂ via la métabolisation d'acide malique et ou citrique conduisant au gonflement des briques UHT ; production de faux-goûts via la présence d'acides organiques et la métabolisation d'acides phénoliques), les solutions techniques suivantes ont été testées :

- 10
- 1) Déacidification des jus sur résine échangeuse d'ions,
 - 2) Utilisation d'eau osmosée (pour évaluer l'impact des minéraux sur les faux-goûts),
 - 3) Utilisation de différents types d'acides pour l'acidification : acide lactique,
- 15 acide citrique ou acide ortho-phosphorique

A partir de toutes ces hypothèses, 7 essais ont été réalisés :

Tableau 8 :

Essais	Type de jus d'orange (24%)	Présence de lait (16%)	Type d'acide pour pH 3,8
SLC	Jus standard (S)	Oui (L)	Acide citrique (C)
DLC	Jus déacidifié (D)	Oui	Acide citrique
SLL	Jus standard	Oui	Acide lactique (L)
DLL	Jus déacidifié	Oui	Acide lactique
DLL osmosé	Jus déacidifié	Oui	Acide lactique
DL	Jus déacidifié	Non	Acide lactique
LL	Pas de jus	Oui	Acide lactique

Résultats :**Tableau 9 :**

MIX		Type d'acide	Essai	Arômes à J 0	Arôme à J30	BILAN
Jus standard	+ lait	+ acide citrique	SLC	Notes « jus » +++ Faux-goûts -	Notes « jus »+ Faux-goûts +++ (foin, terre, étable)	↓ des notes « jus » ↑↑↑ des faux-goûts
	+ lait	+ acide lactique	SLL	Notes « jus »+++ faux-goûts-	Notes « jus » + Faux-goûts +++ (foin, terre, étable)	↓ des notes « jus » ↑↑↑ des faux-goûts
Jus déacidifié	+ lait	+ acide citrique	DLC	Notes « jus » +++ Faux-goûts-	Notes « jus » - Faux-goûts +++ (vinaigre)	↓ des notes « jus » ↑↑↑ des faux-goûts
	+ lait	+ acide lactique	DLL	Notes « jus » - Faux-goûts --	Notes « jus »- Faux-goûts + (rance)	Pas de notes « jus » ↑ des faux-goûts
	+ lait	+ acide lactique	DLL Osmo	Notes « jus » - Faux-goûts --	Notes « jus » - Faux-goûts - (un peu fruité/floral)	Pas de notes « jus » Pas de faux-goûts
	+ lait	+ acide lactique	DL	Notes « jus » +++ faux-goûts ---	Notes « jus » - Faux-goûts - (un peu jus/fruité)	↓ des notes « jus » Pas de faux-goûts
Lait		+ acide lactique	LL	Notes « jus » -- Faux-goûts --	Notes « jus » -- Faux-goûts --- (très fruité/floral)	Pas de notes « jus » Pas de faux-goûts

Remarque : les arômes son évalués de - (intensité très faible de cet arôme) à +++ (intensité très forte de cet arôme). Une flèche vers le bas dans le tableau (↓) indique une diminution, une flèche vers le haut (↑) une augmentation et trois flèche vers le haut (↑↑↑) une augmentation importante des notes aromatiques positives (notes « jus ») et/ou négatives (faux goûts) pour le jus.

10 D'une manière générale, même si l'acide citrique renforce les notes « jus d'orange » dans les produits à J0, à J30 tous les produits ont perdu ces

caractéristiques organoleptiques et sont relativement neutres au niveau des notes fruitées/orange.

Au niveau métabolique, l'acide citrique est bien un précurseur de faux-goûts, car cet acide est métabolisé par *Lactobacillus plantarum* pour former de l'acide acétique
5 (dans le cas de jus déacidifié) ou de l'éthyl phénol (dans le cas de jus standard). Par conséquent, l'ajout d'acide citrique doit être le plus faible possible pour éviter la formation de ces molécules, tout en ayant un effet positif sur les notes « jus ».

Au niveau du type de jus, la déacidification des jus est un procédé permettant d'éviter la formation des faux-goûts (excepté en présence d'acide citrique) et seules
10 des notes rances persistent, principalement dues à la présence de lait. Par conséquent, un ajustement du ratio jus déacidifié/lait doit être réalisé.

Au final, les meilleurs résultats en terme d'absence de faux-goûts (foin, étable, terre, vinaigre, rance) et de présence de notes aromatiques caractéristiques des jus d'orange, sont obtenus avec du jus déacidifié mélangé avec de l'eau osmosée et
15 acidifiée à l'acide lactique.

EXEMPLE 4 : formule du type jus de fruit + lait**Tableau 10 :**

Produit Jus de fruit Orange + Lait à pH cible 3,8	
Eau	Environ 70%
Sucre	Environ 7,5%
Jus d'orange concentré déacidifié	Environ 4,5%
Arôme Orange	0,0054%
Pectine	0,56%
Beta Carotène	0,09%
Lait	Environ 16,5%
Acide lactique	pH final 3,8
<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 9843	Ensemencé 0,1%

5

EXEMPLE 5 : formules orange 50% et 75% de jus.**Tableau 11 :**

Jus de fruit Orange 50% à pH cible 3,6	
Eau	80,4
Sucre	3,5
Jus d'orange concentré déacidifié	11
Pulpe	3,7
Pectine	0,2
Colorant	0,02
Acide lactique	0,4
Acide ascorbique	0,03
Souche de <i>L. plantarum</i> DSM 9843	Ensemencé à 0,1%

Tableau 12 :

Jus de fruit Orange 75% à pH cible 3,6	
Eau	80,2
Sucre	1,3
Jus d'orange concentré désacidifié	13,4
Pulpe	3,9
Pectine	0,2
Colorant	0,02
Acide lactique	0,13
Acide ascorbique	0,03
Souche de <i>L. plantarum</i> DSM 9843	Ensemencé à 0,1%

Revendication

1. Souche de *Lactobacillus plantarum* déposée le 4/04/02 sous le numéro CNCM I-2845 à la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes.

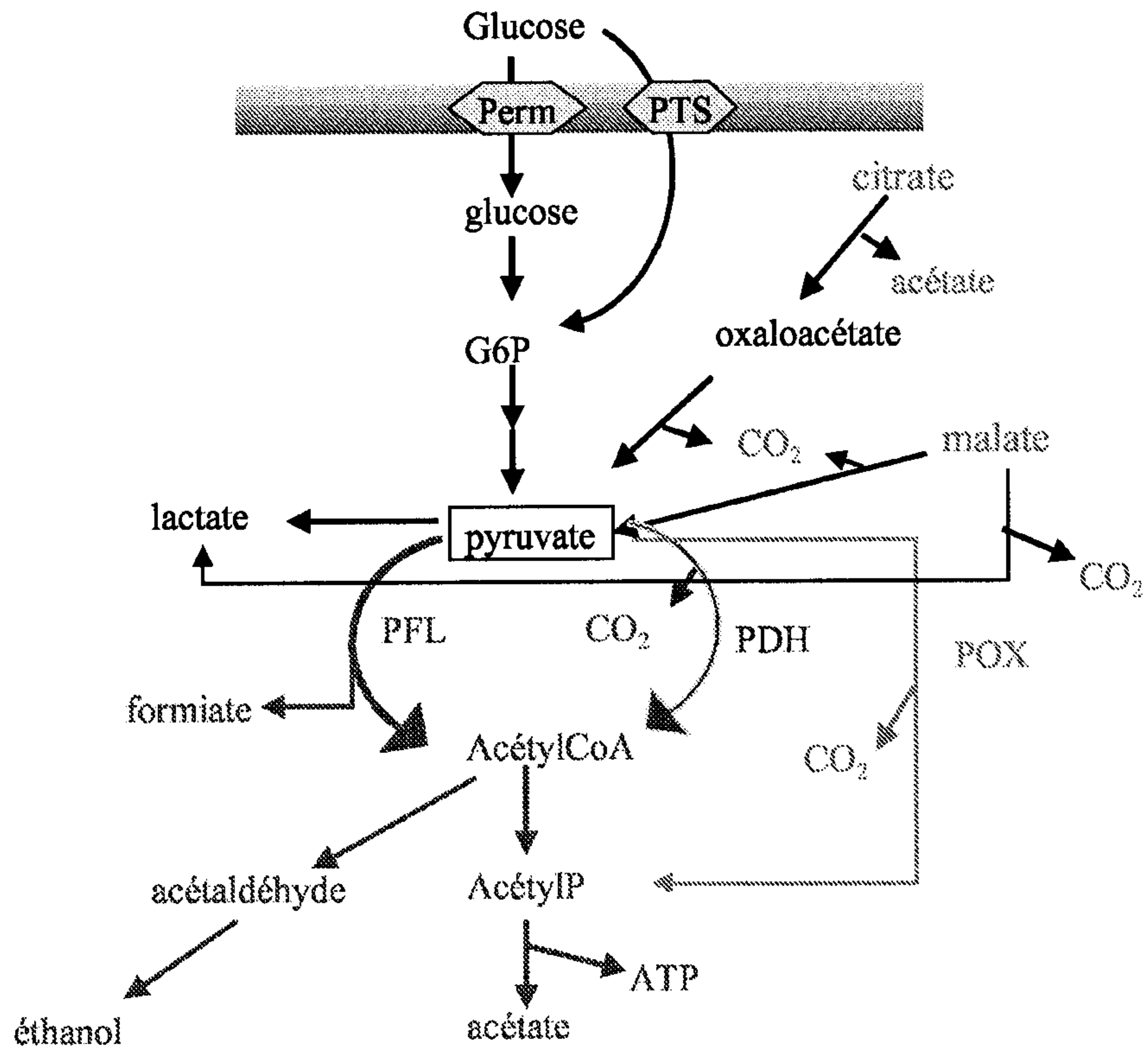


Figure 1