

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



Organización y
Digitalización CSA 444

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

División de Nuevas Creaciones

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

PCT

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

ENTRADA INTERNACIONAL

09-11069

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO GRÁNULOS DE CISTEINA Y SUS USOS COMO ACTIVADORES DE
CRECIMIENTO DE BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS LACTIS

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE COMPAGNIE GERVAIS DANONE

DOMICILIO PARIS, FRANCIA

JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

74. APODERADO

22. SANTAFE DE BOGOTA, D.C.

PETITORIO

AS: 109.246



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-011069- -00000-0000

Fecha: 2009-02-05 16:52:32
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 NUECREACIONE
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 179FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

1

SOLICITUD DE:



Patente de Invención.



Patente de Modelo de Utilidad.



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE

Nombre: **COMPAGNIE GERVAIS DANONE**Dirección: 17 Boulevard Hausmann, F-75009
Paris, Francia.

Nacionalidad o Domicilio: Francia

Lugar de Constitución: Francia

Teléfono:

Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: JUAN PABLO CADENA SARMIENTO

Dirección: Cra. 7 No. 71-21 Torre B – Piso 4,
Bogotá, Colombia.

Teléfono: 744-2200

Fax: 742-2200

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.



NIT



C.E.



Otro



Cual

Número 80.410.337 TP 57492

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: Laurent MARCHAL, Xavier DHOOSCHE.

Dirección: 8, place de la Cholettiere, F-91360 Villemoisson sur Orge, FR; 35, rue
Boucicaut, F-92260 Fontenay aux Roses, FR (Respectivamente).

Nacionalidad o Domicilio: Francia

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/FR2007/000916Fecha 01-06-2007Publicación Internacional No. WO 2008/006949 A1Fecha 17-01-20086 Título (54): **GRANULOS DE CISTEINA Y SUS USOS COMO ACTIVADORES DE CRECIMIENTO DE
BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS LACTIS** *Bifidobacterium animalis lactis*

7 Clasificación Internacional (51):

8 Prioridad

SI ☒NO ☐

(33) País de Origen

FR

(32) Fecha

13-07-2006

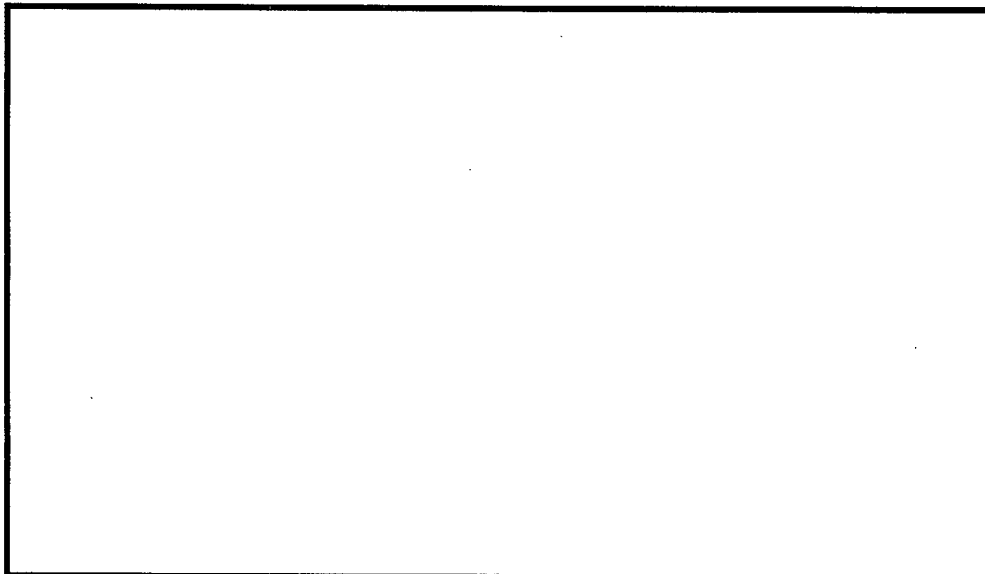
(31) Número de Solicitud

0606421

9 Comprobante de pago No. 08-96,475; 09-1,108; 08-87,522; 08-87,523Fecha 05-02-2009

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. \$ 540.000
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Poderes, si fuere el caso. **Fotocopia autenticada**
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción de examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Tarjeta de Propietarios
Documentos PCT
Comprobante(s) de pago de la tasa por concepto de Reivindicaciones adicionales. \$200.000
(8*\$25.000)

11 FIGURA CARACTERÍSTICA:**12** Solicito la concesión de la patente,**NOMBRE:** JUAN PABLO CADENA SARMIENTO**FIRMA:**

C.C. 80.410.337 de Usaquén TP 57492 del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-011069- -00000-0000

Fecha: 2009-02-05 16:52:32 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 179

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 96,475
FECHA : DICIEMBRE 12 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	3249923	12/12/2008	25,011,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
TOTAL :			\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

109 246

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 1,108
FECHA : ENERO 6 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-011069- -00000-0000

Fecha: 2009-02-05 16:52:32 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 179

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
-------------	-----------	-------	--------	----------	-----------	----------

BRIGARD & CASTRO LTDA	RECIBO DE CAJA			1039	06/01/2009	5,012,000.00
-----------------------	----------------	--	--	------	------------	--------------

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
-------	------------	----------	----------------

1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	998 VALOR COMPLEMENTO TARIFA A#0 ANTR	39,000.00
TOTAL :				\$ 39,000.00

SDN: TREINTA Y NUEVE MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No.

11/24/02 11:41:11 AM

11/24/02 11:41:11 AM

11/24/02 11:41:11 AM

11/24/02 11:41:11 AM

11/24/02 11:41:11 AM

11/24/02 11:41:11 AM

11/24/02 11:41:11 AM

11/24/02 11:41:11 AM

11/24/02 11:41:11 AM

11/24/02 11:41:11 AM

11/24/02 11:41:11 AM

11/24/02 11:41:11 AM

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176087-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 08 - 87,522
FECHA : NOVIEMBRE 6 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-011069- -00000-0000

Fecha: 2009-02-05 16:52:32 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 179

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	79585914	06/11/2008	31,842,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	100,000.00
		TOTAL :	\$ 100,000.00

SON: CIEN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 08 - 87,523
 FECHA : NOVIEMBRE 6 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-011069- -00000-0000

Fecha: 2009-02-05 16:52:32 Dep. 2020 NUECREACIONE
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 179

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BRIGARD & CASTRO LTDA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	79585914	06/11/2008	31,842,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	100,000.00
		TOTAL :	\$ 100,000.00

SON: CIENTO MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
 COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
 SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

(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
17 janvier 2008 (17.01.2008)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2008/006949 A1

(51) Classification internationale des brevets :
A23C 9/13 (2006.01) A23C 9/123 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2007/000916

(22) Date de dépôt international : 1 juin 2007 (01.06.2007)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0606421 13 juillet 2006 (13.07.2006) FR

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

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : MAR-
CHAL, Laurent [FR/FR]; 8, place de la Cholettière,
F-91360 Villemoisson sur Orge (FR). DHOOSCHE,
Xavier [FR/FR]; 35, rue Boucicaut, F-92260 Fontenay
aux Roses (FR).

(74) Mandataires : PARIS, Fabienne etc.; Ernest Gutmann -
Yves Plasseraud S.A., 3, rue Auber, 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, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN,
IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO,
RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasienn (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, MT, 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

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: CYSTEINE GRANULES AND USE THEREOF AS BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS LACTIS GROWTH STIMU-
LANTS

(54) Titre : GRANULES DE CYSTEINE ET LEURS UTILISATIONS A TITRE D'ACTIVATEURS DE CROISSANCE DE BI-
FIDOBACTERIUM ANIMALIS LACTIS

(57) Abstract: The present application relates to an inoculum that is particularly suitable for the direct inoculation of at least one strain of *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* in a dairy substrate, for the conversion of said dairy substrate into a fermented dairy product. This inoculum comprises, in mixture or in collection form, the L-cysteine base and at least one strain of *B. animalis lactis*. Said cysteine and said at least one strain of *B. animalis lactis* are each contained in, or in the form of frozen and/or lyophilizate granules. Advantageously, said cysteine is incorporated within the same granules or the same lyophilizate as the cells of *B. animalis lactis*.

(57) Abrégé : La présente demande est relative à un inoculum qui est spécialement adapté à l'ensemencement direct d'au moins une souche de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* dans un substrat laitier, pour la transformation de ce substrat laitier en produit laitier fermenté. Cet inoculum comprend, en mélange ou sous forme de collection, de la L-cystéine base, et au moins une souche de *B. animalis lactis*. Ladite cystéine et ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* sont chacune contenues dans, ou sous la forme de granule(s) congelé(s) et/ou de lyophilisat(s). Avantagusement, ladite cystéine est intégrée au sein des mêmes granules ou du même lyophilisat que les cellules de *B. animalis lactis*.

WO 2008/006949 A1

TITRE

5 GRANULES DE CYSTÉINE ET LEURS UTILISATIONS A TITRE
D'ACTIVATEURS DE CROISSANCE DE BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS
LACTIS

DOMAINE TECHNIQUE DE L'INVENTION

10 La présente invention est relative à des granules de cystéine, et à leurs
utilisations à titre d'activateurs de croissance de *Bifidobacterium animalis* ssp.
lactis.

ARRIÈRE-PLAN DE L'INVENTION

15 Dans le domaine des produits laitiers, le marché des probiotiques est en
constante augmentation.
Afin de proposer des produits contenant des niveaux élevés de souches
probiotiques tout en apportant des qualités organoleptiques intéressantes, les
industriels laitiers sont confrontés aux problèmes des fermentations mixtes qui
20 mettent en œuvre à la fois des ferments dits techniques ou technologiques, et des
ferments probiotiques.

En effet, les souches dites probiotiques sont représentées par des espèces à
croissances lentes sur substrat laitier (temps de génération de 1h à 2h pour
25 *Bifidobacterium*), alors que les ferments technologiques proviennent des ferments
yoghourt à croissance plutôt rapide (temps de génération de 15 min à 30 min pour
S.thermophilus et *L. bulgaricus*).

Le bon compromis entre la croissance des ferments technologiques et des
probiotiques est difficile à trouver, et la plupart des industriels favorisent l'aspect
30 organoleptique par rapport à la quantité de probiotique : Les populations de
probiotique généralement observées se situent entre 10^6 à 10^7 ufc/g de produit
fermenté.

Aujourd'hui, la plupart des études santé sur ces probiotiques sont réalisées par
des produits contenant au minimum 10^8 ufc/g de souches probiotiques.

La recherche d'un composé activateur de croissance d'un probiotique est basée sur la connaissance approfondie de la souche au niveau de ces besoins nutritifs et à la capacité du substrat laitier à les combler.

- 5 D'autre part, il faut vérifier que ces composés n'exercent pas d'effet négatif, ni ne stimulent la croissance des souches dites techniques, qu'ils soient de qualité alimentaire, et qu'ils ne dégradent pas l'organoleptie du produit.

- 10 En outre, les quantités de composés activateurs que l'on doit mettre en œuvre pour avoir une stimulation et qui remplissent les contraintes ci-dessus sont généralement très faibles en proportion par rapport aux substrats laitiers.

- Ces doses (généralement inférieures à 100mg/L) et les écarts acceptés ne sont pas compatibles avec les systèmes de mesures et d'incorporations utilisés pour réaliser les substrats laitiers, la mise en œuvre industrielle de ces substances
15 devient alors problématique.

- Le problème est encore plus délicat lorsque les souches dites techniques mises en œuvre doivent fonctionner dans le cadre d'une symbiose de plusieurs souches de bactéries lactiques, comme c'est le cas pour les laits fermentés qui mettent en
20 œuvre une fermentation symbiotique *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, en sus de la fermentation lactique menée par les probiotiques.

- Différents tests ont été conduits dans l'art antérieur afin de déterminer des conditions permettant de favoriser la croissance des probiotiques. La plupart de
25 ces essais ont néanmoins été menés sur des cultures pures de bactéries probiotiques, sans tenir compte de l'éventuelle présence et activité d'autres souches lactiques lors de la fabrication du produit en milieu industriel.

- Une solution est décrite dans la demande de brevet française FR 05 07529
30 déposée le 15 juillet 2005 au nom de Compagnie Gervais Danone : elle propose d'utiliser un acide aminé soufré à titre d'activateur des bifidobactéries.

La présente demande propose un perfectionnement qui est spécialement adapté aux souches de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*. La présente demande

propose ainsi un inoculum qui ne présente pas les inconvénients de l'art antérieur, et qui résout le problème de l'activation et/ou stimulation simple, sûre et efficace de *B. animalis lactis* lors de la production en milieu industriel d'un produit laitier fermenté à valeur probiotique qui est destiné à la consommation humaine, et plus particulièrement d'un produit laitier fermenté qui, en sus de la fermentation opérée par le probiotique *B. animalis lactis*, met en œuvre la fermentation symbiotique *S. thermophilus* – *L. bulgaricus*.

RÉSUMÉ DE L'INVENTION

10

La présente invention est relative à un inoculum perfectionné de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, aux utilisations de cet inoculum, et aux produits laitiers fermentés obtenus à l'aide de cet inoculum.

L'inoculum de l'invention est spécialement adapté à l'ensemencement direct d'au moins une souche de *B. animalis lactis* dans un substrat laitier, pour la transformation de ce substrat laitier en produit laitier fermenté adapté à la consommation humaine, et plus particulièrement en produit laitier fermenté à valeur probiotique contenant au moins une souche de *B. animalis lactis*.

20 L'inoculum comprend, en mélange ou sous forme de collection, des granules congelés et/ou un(des) lyophilisat(s), dans lesquels se trouvent une L-cystéine particulière, et au moins une souche de *B. animalis lactis*.

Les inventeurs ont sélectionné une forme particulière de cystéine, à savoir une L-cystéine qui est sous une forme telle que les granules et/ou lyophilisat(s) produits à partir de cette cystéine ont (une fois décongelés et/ou re-solubilisé(s)) un pH qui est au moins égal à 4. Un exemple d'une L-cystéine appropriée est la L-cystéine communément appelée cystéine base (dont la formule sous forme réduite est $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$).

25 Cette forme particulière de cystéine est plus efficace que les autres formes de cystéine habituellement utilisées (généralement, de la cystéine-HCl, sous forme de chlorhydrate monohydraté de cystéine).

30 Malgré la faible solubilité de la L-cystéine particulière sélectionnée par les inventeurs, les inventeurs ont réussi à produire un inoculum sous forme de granules congelés et/ou de lyophilisat(s), qui combine ou intègre cellules de *B.*

animalis lactis et cette forme particulière de L-cystéine, sans pour autant nuire à l'état physiologique et/ou au métabolisme de *B. animalis lactis*.

Dans une version dite « intégrée » de l'inoculum selon l'invention, au moins un granule ou lyophilisat de l'inoculum contient à la fois cellules de *B. animalis lactis* et cette forme particulière de L-cystéine. Dans une version dite « combinée » de l'inoculum selon l'invention, une partie des granules ou un lyophilisat contient la L-cystéine particulière conforme à l'invention, et une autre partie des granules ou un autre lyophilisat contient les cellules de *B. animalis lactis*.

La présente invention propose donc un inoculum de *B. animalis lactis* à activateur cystéine combiné ou intégré.

De manière remarquable, l'inoculum selon l'invention permet d'obtenir une population de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*), qui ne descend pas au-dessous de $5 \cdot 10^7$ ufc, de préférence pas au-dessous de 10^8 ufc, par gramme de produit fermenté, après au moins 20 jours, de préférence au moins 30 jours de conservation dudit produit fermenté à une température comprise entre 4 et 11°C (cf. Figures 8 et 9).

L'inoculum selon l'invention est spécialement adapté à la production de lait fermenté à haute valeur probiotique, dans la mesure où il permet de maintenir une très forte teneur en *B. animalis lactis* au cours de la conservation du produit en milieu réfrigéré, et dans la mesure où l'activateur L-cystéine particulier utilisé est présent à des doses telles que ni sur la symbiose *S. thermophilus* + *L. bulgaricus*, ni les qualités organoleptiques du lait fermenté, ne s'en trouvent négativement affectées.

BRÈVE DESCRIPTION DES FIGURES

Dans la présente demande de brevet, il est fait référence aux figures suivantes :

Figure 1 : schéma de principe de :

- la solution combinée, qui propose de produire des granules de ferment(s) probiotique(s) et des granules de cystéine, ces deux types de granules pouvant être ensuite mélangés ensemble, et de
- la solution intégrée, qui propose de produire des granules contenant à la fois le(s) ferment(s) probiotique(s) et de la cystéine.

Figure 2 : schéma de principe de la production de granules intégrés (cystéine HCl + ferment(s) probiotique(s)) : ferment *Bifidobacterium animalis lactis* souche I-2494 ou souche BB12®, formulé en granules intégrés, contenant à la fois le ferment probiotique et de la cystéine, la cystéine étant ici de la cystéine HCl.

Figure 3 : évolution du pH au cours du temps pour un mix laitier inoculé avec :

- des granules de *Bifidobacterium animalis lactis* souche I-2494 (courbe témoin, située en bas), ou avec
- des granules intégrés contenant à la fois *Bifidobacterium animalis lactis* souche I-2494 et cystéine HCL (courbe du haut),

illustrant la dégradation de l'état physiologique qui est subie par le probiotique *Bifidobacterium animalis lactis*, lorsqu'il est formulé avec de la cystéine HCl au sein de mêmes granules (formulation intégrée avec Cystéine HCl).

Figure 4 : schéma de principe de la production de granules intégrés (cystéine base + ferment(s) probiotique(s)) : ferment *Bifidobacterium animalis lactis* souche I-2494 ou souche BB12®, formulé en granules intégrés, contenant à la fois le ferment probiotique et de la cystéine, la cystéine étant ici de la cystéine base.

Figure 5 : évolution du pH au cours du temps pour un mix laitier inoculé avec :

- des granules de *Bifidobacterium animalis lactis* souche I-2494 (courbe témoin, située en haut), ou avec
- des granules intégrés contenant à la fois *Bifidobacterium animalis lactis* souche I-2494 et de la cystéine base (courbe du bas),

illustrant le fait que la sélection de cystéine base pour la formulation de granules intégrés de (*Bifidobacterium animalis lactis* + cystéine) permet de ne pas détériorer l'état physiologique de ce probiotique.

Figures 6 à 9 : comparaison de mix laitiers,

- qui sontensemencés à hauteur de 0,5 g/L par des granules congelés de ferments techniques (mélange de granules de *S. thermophilus* I-1630, *L. bulgaricus* - I-1632 et *L. bulgaricus* I-1519), et des granules congelés de ferment probiotique *Bifidobacterium animalis lactis* (souche BB12®, ou souche I-2494), et
- dans lesquels on apporte de la cystéine base sous forme de granules de cystéine distincts des granules de ferment probiotique (solution combinée G4), ou bien sous forme intégrée aux granules de ferment probiotique (solution intégrée G4I), par comparaison au mix témoin dans lequel de l'eau est apportée en lieu et place de la cystéine intégrée ;

Figures 6 et 7 : évolution du pH au cours du temps (en heures) ;

Figures 8 et 9 : évolution de la biomasse (UFC/mL) au cours du temps (en jours) lors de la conservation du produit laitier fermenté à 10°C ;

Figures 6 et 8: ferment probiotique *Bifidobacterium animalis lactis* souche BB12®

- mix laitier BB12® T = mix laitierensemencé à hauteur de 0,5 g/L par un mélange de granules de ferments techniques et de granules témoin de ferment *Bifidobacterium* BB12® (granules contenant de l'eau en lieu et place de la cystéine),
- mix laitier BB12® G4 = mix laitierensemencé comme le mix laitier BB12® T, à savoir à hauteur de 0,5 g/L par un mélange de granules de ferments techniques et de granules témoin de ferment *Bifidobacterium* BB12®, mais dans lequel on ajoute de la cystéine base sous forme de granules congelés distincts des granules de probiotique, de sorte à apporter une concentration de 7,5 mg/L de cystéine dans le mix,
- mix laitier BB12® G4I = mix laitierensemencé à hauteur de 0,5 g/L par un mélange de granules de ferments techniques et de granules intégrés de ferment *Bifidobacterium* BB12®, ces granules intégrés de probiotique contenant de la cystéine base, de sorte à apporter 7,5 mg/L de cystéine base dans le mix ;

Figures 7 et 9 : ferment probiotique *Bifidobacterium animalis lactis* I-2494

- mix laitier I-2494 T = mix laitierensemencé à hauteur de 0,5 g/L par un mélange de granules de ferments techniques et de granules témoin de ferment *Bifidobacterium* I-2494 (granules contenant de l'eau en lieu et place de la cystéine),
- 5 - mix laitier I-2494 G4 = mix laitierensemencé comme le mix laitier I-2494 T, à savoir à hauteur de 0,5 g/L par un mélange de granules de ferments techniques et de granules témoin de ferment *Bifidobacterium* I-2494, mais dans lequel on ajoute de la cystéine base sous forme de granules congelés distincts des granules de probiotique, de sorte à apporter une
- 10 concentration de 7,5 mg/L de cystéine dans le mix,
- mix laitier I-2494 G4I = mix laitierensemencé à hauteur de 0,5 g/L par un mélange de granules de ferments techniques et de granules intégrés de ferment *Bifidobacterium* I-2494, ces granules intégrés de probiotique contenant de la cystéine base, de sorte à apporter 7,5 mg/L de cystéine
- 15 base dans le mix.

DESCRIPTION DETAILLÉE

Quelques définitions :

20

Dans la présente demande, on donne à tous les termes la portée et la signification qu'ils prennent usuellement dans le domaine de l'industrie laitière et/ou de l'industrie alimentaire.

Ainsi, lorsqu'il est fait référence à une « fermentation lactique », il s'agit d'une

25 fermentation lactique acidifiante, qui se traduit par une acidification suite à la production d'acide lactique pouvant s'accompagner de production d'autres acides, de dioxyde de carbone, et de diverses substances telles que des exopolysaccharides (EPS) ou des substances aromatiques, par exemple diacétyl et acétaldéhyde.

30 De même, on entend par « ferment lactique », un microorganisme ou une souche de microorganismes vivant ou viable, qui est capable de mener une telle fermentation lactique acidifiante sur un substrat laitier.

On donne au terme « laits fermentés » sa signification usuelle dans le domaine de l'industrie laitière, c'est-à-dire des produits qui sont destinés à la consommation

animale, et plus particulièrement humaine, et qui sont issus de la fermentation lactique acidifiante d'un substrat laitier. Ces produits peuvent contenir des ingrédients secondaires tels que fruits, végétaux, sucres, arômes, etc.

- 5 L'appellation de « lait fermenté » répond à des normes officielles strictes. On peut ainsi se reporter au Codex Alimentarius (préparé par la Commission du Codex Alimentarius sous l'égide de la FAO et de l'OMS, et publié par la Division Information de la FAO, disponible en ligne sur <http://codexalimentarius.net> ; cf. plus particulièrement, le volume 12 du Codex Alimentarius « Normes Codes pour le lait et les produits laitiers », et la norme « CODEX STAN A-11(a)-1975 », dont
10 le contenu est incorporé dans la présente demande par référence).

- On peut plus particulièrement se reporter au Décret français n°88-1203 du 30 décembre 1988 relatif aux laits fermentés et au yoghourt ou yaourt, publié au Journal Officiel de la République Française du 31 décembre 1988. Le contenu de
15 ce Décret est incorporé dans la présente demande par référence.

- Le terme « lait fermenté » est ainsi réservé dans la présente demande au produit laitier préparé avec un substrat laitier qui a subi un traitement au moins équivalent à la pasteurisation,ensemencé avec des microorganismes appartenant à
20 l'espèce ou aux espèces caractéristiques de chaque produit. La coagulation des « laits fermentés » ne doit pas être obtenue par d'autres moyens que ceux qui résultent de l'activité des microorganismes utilisés.

- Un « lait fermenté » n'a subi aucun traitement permettant de soustraire un
25 élément constitutif du substrat laitier mis en œuvre, et notamment n'a pas subi un égouttage du coagulum.

- Un « lait fermenté » peut être additionné d'un ou plusieurs extraits d'arômes, d'un ou plusieurs arômes naturels, ainsi que, dans la limite de 30 pour 100 en poids du produit fini, d'un ou plusieurs sucres et autres denrées alimentaires
30 conférant une saveur spécifique, voire de céréales.

L'incorporation en tant que produits de substitution de matières grasses et/ou protéiques d'origine non laitière est interdite.

La quantité d'acide lactique libre contenue dans un lait fermenté ne doit pas être inférieure à 0,6 gramme pour 100 grammes lors de la vente au consommateur, et la teneur en matière protéique rapportée à la partie lactée ne doit pas être inférieure à celle d'un lait normal.

5

Le terme « substrat laitier » est, dans la présente demande, entendu comme signifiant « lait » au sens où l'entend l'industrie laitière, c'est-à-dire un substrat contenant essentiellement du lait et/ou des composants du lait, et dont la composition est telle que la fermentation lactique de ce substrat laitier par des
10 souches de bactérie(s) lactique(s), telle(s) que *S. thermophilus* et/ou *L. bulgaricus*, conduit à un produit qui peut être destiné à l'alimentation humaine, et plus particulièrement qui répond à l'appellation de lait fermenté.

Le terme « substrat laitier » couvre ainsi le lait d'origine animale sous toutes ses formes et dans toutes ses variantes de compositions : lait écrémé ou non, lait
15 concentré ou non, lait ultrafiltré ou non, lait frais ou non, lait en poudre ou non, lait reconstitué ou non, lait recombinaison ou non, lait enrichi en constituants du lait ou non, lait additionné ou non d'agents utiles à la fabrication ou à la qualité du produit fini, tels que agents de saveur, arômes, sucres, etc. Par exemple, un substrat laitier destiné à la fabrication de laits fermentés, peut comprendre du lait
20 écrémé, de la crème et de la poudre de lait écrémé (cf. exemple 1 ci-dessous).

Le terme « substrat laitier » n'inclut toutefois pas dans sa portée la signification de « milieu de culture ». En effet, le terme « milieu de culture » vise un milieu destiné à favoriser et/ou stimuler la croissance de bactéries lactiques, et par là, à produire
25 un inoculum de bactéries lactiques, alors que le terme « substrat laitier » vise un milieu qui est destiné à subir une transformation par fermentation, pour produire un aliment destiné à une consommation humaine. Ainsi, de nombreux composés qui peuvent être ajoutés dans un milieu de culture pour stimuler et/ou favoriser la croissance des bactéries lactiques, ne peuvent être ajoutés dans un substrat
30 laitier pour l'obtention d'un lait fermenté ou yaourt.

C'est notamment le cas :

- de nombreux agents tensio-actifs et/ou émulsifiants et/ou agents solubilisants et/ou détergents, tels que le polyoxyéthylène-

sorbitan-20-monooleate (aussi connu sous le nom de polysorbate 80, ou de Tween 80),

- d'acides de type citrate, acétate,
- d'extraits de viande,
- 5 - peptones végétales,
- glycérophosphate.

Les ferments lactiques les plus couramment utilisés comprennent les bactéries lactiques suivantes :

- 10 - des *Streptococcus thermophilus* (par exemple, la souche I-1630 disponible auprès de la CNCM), et
- des *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, ou *Lactobacillus bulgaricus* (par exemple, les souches I-1519 et I-1362 disponibles auprès de la CNCM),
- 15 - des *Pediococcus acidilacti*,
- des *Leuconostoc*, telles que les :
 - *Leuconostoc cremoris*,
 - *Leuconostoc dextranicum*,
 - *Leuconostoc lactis*,
- 20 - des *Lactobacillus*, telles que les :
 - *Lactobacillus acidophilus* (par exemple, la souche I-0967 disponible auprès de la CNCM),
 - *Lactobacillus casei* (par exemple, la souche I-518 disponible auprès de la CNCM),
 - 25 ▪ *Lactobacillus helveticus*,
 - *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* (par exemple, la souche I-2843 disponible auprès de la CNCM),
- des *Lactococcus*, telles que les :
 - *Lactococcus cremoris*,
 - 30 ▪ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (par exemple, la souche I-1631 disponible auprès de la CNCM),
 - *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* (par exemple, la souche I-2806 disponible auprès de la CNCM),

- des *Bifidobacterium*, telles que les :

- *Bifidobacterium animalis lactis* (par exemple, la souche I-2494 disponible auprès de la CNCM, ou la souche commercialisée sous la référence BB12® par Chr. Hansen),
- *Bifidobacterium breve*,
- *Bifidobacterium bifidum*,
- *Bifidobacterium longum*,
- *Bifidobacterium infantis*.

Les bactéries lactiques sont définies comme étant des bactéries lactiques vivantes qui, lorsqu'elles sont consommées en quantités suffisantes, ont des effets bénéfiques sur la santé, au-delà de leur valeur nutritionnelle de base (définition officielle de l'Organisation Mondiale de la Santé).

Les bactéries lactiques probiotiques comprennent notamment les bactéries lactiques suivantes :

- des *Lactobacillus*, telles que les :

- *Lactobacillus acidophilus* (par exemple, la souche I-0967 disponible auprès de la CNCM),
- *Lactobacillus casei* (par exemple, la souche I-518 disponible auprès de la CNCM),
- *Lactobacillus helveticus*,
- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* (par exemple, la souche I-2843 disponible auprès de la CNCM),

- des *Bifidobacterium*, telles que les :

- *Bifidobacterium animalis lactis* (par exemple, la souche I-2494 disponible auprès de la CNCM, ou la souche commercialisée sous la référence BB12® par Chr. Hansen),
- *Bifidobacterium breve*,
- *Bifidobacterium bifidum*,
- *Bifidobacterium longum*,
- *Bifidobacterium infantis*.

Les bactéries lactiques probiotiques ne sont pas de simples additifs alimentaires, qu'il suffirait d'ajouter en masse au produit laitier. Il s'agit de bactéries vivantes, qui mènent une fermentation acidifiante, et dont le métabolisme est affecté par les conditions sous lesquelles elles se trouvent lors de la fabrication du produit laitier fermenté, puis ensuite lors de la conservation du produit laitier fermenté jusqu'à la date limite de consommation (DLC).

Les dates limites de consommation dépendent des durées légales de conservation fixées par la législation en vigueur. Pour les produits laitiers fermentés frais, tels que les laits fermentés, la DLC est généralement de 30 jours à compter de la date de fabrication.

Par ferment, bactérie ou souche technique, il est ici entendu un ferment, bactérie ou souche qui participe à la structure et/ou à la texture du produit laitier fermenté, par opposition au ferment, bactérie ou souche à fonction essentiellement probiotique.

Par exemple, on peut produire un lait fermenté par fermentation symbiotique *L. bulgaricus* – *S. thermophilus*, en mettant également en œuvre au moins une souche de *B. animalis lactis* à titre de souche probiotique. Dans ce cas de figure, les souches dites techniques sont les souches de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*.

Démarche et aspects de l'invention :

L'invention est relative à un inoculum qui est spécialement adapté à l'ensemencement direct d'au moins une souche de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* dans un substrat laitier, pour la transformation de ce substrat laitier en produit laitier fermenté qui est adapté à la consommation humaine et qui est à valeur probiotique, ainsi qu'aux utilisations de cet inoculum dans le cadre de la production de tels produits laitiers.

L'inoculum selon l'invention est plus particulièrement adapté à la production de produit laitier fermenté, qui est obtenu par fermentation d'un substrat laitier par le probiotique *B. animalis lactis*, et par la symbiose *S. thermophilus* – *L. bulgaricus*. Un tel produit contient alors au moins une souche de *S. thermophilus*, au moins

une souche de *L. bulgaricus* et au moins une souche de *B. animalis lactis* sous forme vivante.

L'inoculum selon l'invention comprend au moins une souche de *B. animalis lactis*.

5

L'inoculum selon l'invention comprend une cystéine particulière, à savoir de la L-cystéine qui est sous une forme telle que les granules et/ou lyophilisat(s) qui sont obtenus en utilisant cette forme de L-cystéine sont tels que le pH de la solution obtenue après :

- 10 - décongélation dudit(desdits) granule(s), et/ou
 - re-solubilisation dudit(desdits) lyophilisat(s) dans une proportion allant de 1 à 2 gramme(s) de lyophilisat(s) pour 8 à 10 mL d'H₂O,
est au moins égal à 4.

De préférence, ce pH ne dépasse pas le pH de 8.

- 15 Pour ce faire, on choisira de préférence une L-cystéine sous une forme telle qu'elle présente un pH qui est au-dessus de 4 lorsqu'elle est en placée en solution. Par exemple, une solution contenant 1,25 gramme de cette forme de cystéine pour 50 mL d'H₂O présente un pH qui va de 4,5 à 5,5.

- Un exemple d'une telle forme de cystéine est la L-cystéine communément
20 appelée L-cystéine base (ou L-cystéine sous forme base). Sous forme réduite, la L-cystéine base a pour formule HSCH₂CH(NH₂)CO₂H.

La L-cystéine base n'est pas de la cystéine-HCl: elle n'est donc ni un chlorhydrate de cystéine, ni un chlorhydrate monohydraté de cystéine.

- Le choix de cette cystéine particulière résulte d'une sélection faite parmi les
25 différentes formes de cystéine disponibles.

Cette cystéine particulière est assimilable par *B. animalis lactis*, et est un activateur de la croissance de *B. animalis lactis* sur substrat laitier.

- Cette cystéine particulière est adaptée à la consommation humaine. Elle est conforme aux législations relatives aux produits laitiers fermentés destinés à la
30 consommation humaine.

Cette cystéine particulière permet en outre de stimuler la croissance, ou à tout le moins de métabolisme de *B. animalis lactis*, sans perturber le métabolisme d'autres bactéries lactiques non probiotiques, et notamment sans perturber la fermentation lactique symbiotique exercée par *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*.

En sus de toutes ces propriétés, cette cystéine particulière permet de produire un inoculum dit intégré qui comprend à la fois ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* et la cystéine dans une même unité physique, sans que la croissance, ou à tout le moins le métabolisme, de cette souche de *B. animalis lactis* n'en soit négativement affecté.

De manière très préférentielle, l'inoculum selon l'invention ne comprend pas de cystéine sous forme acide, telle que la cystéine-HCl (chlorhydrate de L-cystéine de formule $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}\cdot\text{HCl}$).

10 L'inoculum selon l'invention se présente sous une forme physique particulière. Il se présente sous la forme de granule(s) congelé(s) et/ou lyophilisat(s).

Cette forme particulière d'inoculum est spécialement adaptée à l'ensemencement direct.

Le choix de la cystéine particulière ci-dessus mentionnée permet de fabriquer l'inoculum sous ces particularités, et d'obtenir un inoculum particulièrement actif.

15 Le choix de la L-cystéine particulière de l'invention permet mélanger ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* et ladite cystéine ensemble, pour produire des granules congelés et/ou lyophilisat(s) qui comprennent à la fois cette souche de *B. animalis lactis* et cette cystéine au sein de mêmes granules et/ou au sein d'un même lyophilisat, sans que la croissance, ou à tout le moins le métabolisme, de cette souche de *B. animalis lactis* n'en soit négativement associé.

20 De tels résultats ne peuvent être atteints en utilisant de la cystéine sous forme acide, telle que la cystéine-HCl (chlorhydrate de L-cystéine de formule $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}\cdot\text{HCl}$), en lieu et place de la L-cystéine base.

25

Les inventeurs proposent ainsi un granule congelé ou un lyophilisat, dans lequel se trouvent à la fois des cellules de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* et de ladite L-cystéine particulière. Ce granule congelé ou lyophilisat peut être qualifié d'inoculum de *B. animalis lactis* à activateur intégré. Ce granule congelé ou lyophilisat est un mode de réalisation préféré de l'invention.

30

Une alternative à la voie de l'intégration de l'activateur peut consister à ne pas associer l'activateur au sein d'un même granule ou lyophilisat avec la souche de *B. animalis lactis*, mais à produire des granules congelés ou lyophilisats distincts.

On peut, par exemple, produire et combiner ensemble, par exemple sous forme de mélange ou d'association (« kit-of-parts ») :

- 5 - des granules congelés contenant des cellules de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis*, et des granules congelés distincts contenant ladite L-cystéine particulière (= granules non intégrés mais combinés) ; ou
- 10 - un lyophilisat contenant des cellules de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis*, et un lyophilisat contenant ladite L-cystéine particulière (=lyophilisats non intégrés, mais combinés) ;
ou
- 15 - des granules congelés contenant des cellules de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis*, et un lyophilisat contenant ladite L-cystéine particulière, ou inversement (= combinaison de granules et de lyophilisat(s)); ou bien encore
- un mélange de ces alternatives,

Ces inoculums sont des alternatives directes au granule congelé ou lyophilisat intégré, dans la mesure où ils consistent à combiner ensemble les moyens de l'invention, mais sous des formes physiques distinctes.

20 Ces inoculums sont ici qualifiés de « combinés », et entrent dans le champ de la présente demande.

La figure 1 donne une illustration du mode de production de granules intégrés selon l'invention, et du mode de production de granules combinés selon l'invention.

25 L'invention résulte ainsi de la combinaison d'une sélection de cystéine particulière (préférentiellement, L-cystéine base) et de la mise au point d'une forme physique particulière (granules congelés et/ou lyophilisat(s)), qui est spécialement adaptée à l'ensemencement direct.

30 L'inoculum selon l'invention est en outre spécialement adapté à la stimulation de la croissance des souches de *B. animalis lactis*. Il peut ne pas être adapté à la stimulation d'autres espèces ou genres de bactéries probiotiques.

Pour stimuler la croissance des souches de *B. animalis lactis*, il faut disposer d'un activateur de croissance qui exerce un effet positif sur la croissance, ou à tout le moins sur le métabolisme, de *B. animalis lactis*, sans pour autant exercer un effet négatif ou délétère sur la texture, ni la structure, ni la qualité sanitaire et gustative du produit laitier fermenté obtenu.

Ce problème est particulièrement délicat, lorsqu'il s'agit de produire des produits laitiers fermentés qui, en sus de *B. animalis lactis*, nécessitent de mettre en œuvre d'autres bactéries lactiques.

Chacune des bactéries lactiques mises en œuvre n'ont en effet pas nécessairement toutes le même métabolisme, et des conditions favorables à une espèce ou un genre ne sont pas nécessairement favorables à une autre espèce ou un autre genre.

Ainsi, il peut être délicat de trouver des conditions de fermentation lactique qui conviennent à l'ensemble des souches mises en œuvre.

A cet élément, s'ajoute le fait que la fermentation lactique doit répondre à des contraintes de cinétique d'acidification bien particulière, pour parvenir à fabriquer un produit laitier fermenté sain et de qualité.

Il est souhaitable d'obtenir un pH de 5,5 aussi rapidement que possible, de manière à limiter les divers risques de contaminations. Une cinétique rapide d'acidification va toutefois à l'encontre d'une bonne croissance et/ou d'un bon métabolisme de *B. animalis lactis*.

Le cas des laits fermentés obtenus par fermentation de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, et en outre, par fermentation du probiotique *B. animalis lactis*, est particulièrement délicat, dans la mesure où, en sus de la fermentation de *B. animalis lactis*, doit être menée une fermentation lactique symbiotique qui implique au moins une souche de *Streptococcus thermophilus*, et au moins une souche de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

Or, *B. animalis lactis* est une espèce à croissance lente sur substrat laitier (temps de génération de l'ordre de 1 à 2 heures), alors que les ferments techniques *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* sont à croissance rapide (temps de génération de l'ordre de 15 à 30 min).

Dans ces circonstances, il est particulièrement complexe de parvenir à maîtriser l'ensemble des paramètres.

L'inoculum selon l'invention est donc spécialement conçu pour ne pas exercer d'effet négatif sur la fermentation qui pourrait être menée par des souches de bactéries lactiques dites techniques, et notamment sur la fermentation symbiotique de *Streptococcus thermophilus*, et de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

Ainsi, l'inoculum selon l'invention est spécialement adapté à une mise en œuvre dans le cadre de la production d'un lait fermenté qui comprend au moins une souche de *B. animalis lactis* à titre de souche probiotique, et qui est obtenu par fermentation d'un substrat laitier par au moins une souche de *Streptococcus thermophilus*, et au moins une souche de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, en sus de la fermentation opérée par *B. animalis lactis*.

L'inoculum selon l'invention répond aux différentes contraintes, et permet d'obtenir un produit laitier fermenté à haute valeur probiotique, qui est de qualité exceptionnelle.

Ceci étant, le fait que l'inoculum selon l'invention soit optimisé pour la situation particulièrement complexe posée par la fermentation symbiotique de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus* en présence d'une fermentation de *B. animalis lactis*, n'empêche évidemment pas de l'utiliser dans des situations moins complexes, telles que celle de la fermentation d'un substrat laitier qui ne mettrait en œuvre qu'un genre ou espèce de bactérie lactique autre que *B. animalis lactis*, en sus de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis*, ou qui ne mettrait en œuvre que des souches de *B. animalis lactis*.

Un des avantages de l'inoculum selon l'invention est qu'il permet d'obtenir une population de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*), qui est nettement supérieure à celle qui serait obtenue dans les mêmes conditions mais en utilisant un inoculum classique de la même souche de *B. animalis lactis* sans activateur de croissance, et est également nettement supérieure à celle qui serait obtenue dans les mêmes conditions mais en utilisant un inoculum de la même souche de *B. animalis lactis* et de la cystéine-HCl à titre d'activateur de croissance.

L'inoculum selon l'invention permet ainsi d'obtenir une population de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*), qui est d'au moins 5.10^7 ufc par gramme de produit fermenté en fin de fermentation, de préférence d'au moins 10^8 ufc par gramme de produit fermenté en fin de fermentation.

De manière remarquable, l'inoculum selon l'invention présente l'avantage de permettre d'obtenir une population de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*), qui ne descend pas au-dessous de 5.10^7 ufc par gramme de produit fermenté, après au moins 20 jours, de préférence au moins 30 jours de conservation dudit produit fermenté à une température comprise entre 4 et 11°C, de préférence à une température comprise entre 4 et 10°C, très préférentiellement à une température comprise entre 4 et 9°C.

De manière particulièrement remarquable, l'inoculum selon l'invention présente l'avantage de permettre d'obtenir une population de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*), qui ne descend pas au-dessous de 10^8 ufc par gramme de produit fermenté, après au moins 20 jours, de préférence au moins 30 jours de conservation dudit produit fermenté à une température comprise entre 4 et 11°C, de préférence à une température comprise entre 4 et 10°C, très préférentiellement à une température comprise entre 4 et 9°C : cf. Figures 8 et 9, illustrant le maintien jusqu'à au moins 30 jours de conservation à 10°C de la population de *B. animalis lactis* dans des laits fermentés (*S. thermophilus* – *L. bulgaricus* + *B. animalis lactis*) produits à l'aide d'un inoculum conforme à l'invention, par comparaison aux laits fermentés témoins, dont la population de *B. animalis lactis* chute rapidement à compter du 21^{ème} jour.

Un autre avantage de l'inoculum selon l'invention est qu'il se présente sous une forme qui est adaptée à une mise en œuvre dans un contexte industriel.

En effet, l'inoculum selon l'invention est sous une forme perfectionnée qui permet de le mettre en œuvre de manière particulière sûre et facile dans le cadre d'une production industrielle de produit laitier fermenté.

Les doses d'activateurs de croissance et les écarts acceptés peuvent être parfois délicats à maîtriser en regard des systèmes de mesures et d'incorporation utilisés pour réaliser les produits laitiers fermentés en milieu industriel. Par exemple, un excès d'activateur, s'il est bénéfique pour la souche probiotique, est généralement très néfaste à la qualité du produit laitier fermenté obtenu : il peut conférer un goût non apprécié (par exemple, goût soufré pour de la cystéine versée en excès), il peut exercer des effets négatifs ou délétères sur la fermentation des souches techniques (c'est par exemple le cas pour *S. thermophilus*, lorsqu'un excès de cystéine est utilisé). La maîtrise des quantités d'activateur ajouté présente également un intérêt sur le plan sanitaire, dans la mesure où cette maîtrise limite les interventions humaines, et les modifications et adaptations de circuits industriels, dont la qualité sanitaire doit être absolument garantie. La maîtrise des quantités d'activateur ajouté présente bien sûr également un intérêt économique. Il peut donc se trouver que la personne du métier dispose d'un activateur de croissance adapté, mais qu'elle connaisse des difficultés lors de sa mise en œuvre en milieu industriel, car la maîtrise de la quantité d'activateur ajouté apparaît délicate dans ce contexte.

L'inoculum selon l'invention est quant à lui très aisé à mettre en œuvre dans un contexte industriel, et permet de maîtriser de manière sûre et simple les quantités d'activateur mises en œuvre. L'inoculum selon l'invention est donc plus aisé à mettre, et permet de fabriquer de manière efficace et sûre en milieu industriel des produits laitiers fermentés qui présentent d'excellentes qualités texturale, structurale et gustative, et qui contiennent le probiotique *B. animalis lactis* à dose particulièrement élevée.

25

L'inoculum de l'invention est le résultat d'un compromis délicat entre notamment :

- l'exigence de préserver d'excellentes qualités du produit laitier fermenté pour le consommateur (qualités de structure, de texture, qualités sanitaires, qualités gustatives),
- 30 - le souhait d'encore améliorer la teneur en *B. animalis lactis*, de sorte à accentuer les effets probiotiques du produit, et
- la volonté de disposer d'un inoculum sous forme perfectionnée, qui est spécialement adapté à l'ensemencement direct, et qui

permet de maîtriser en toute sécurité et en toute simplicité les quantités d'activateurs ajoutés.

L'inoculum selon l'invention répond à ces différents objectifs.

5

L'inoculum selon l'invention comprend en mélange ou sous forme de collection (« kit-of-parts ») :

- au moins une souche de *B. animalis lactis*, et
- de la L-cystéine dite sous forme libre (c'est-à-dire de la L-cystéine qui est non liée à d'autres acides aminés par liaison peptidique), cette L-cystéine sous forme libre étant en outre sous une forme telle qu'elle permet d'obtenir des granules et/ou lyophilisat(s) qui sont tels que le pH de la solution obtenue après :
 - o décongélation dudit(desdits) granule(s), et/ou
 - o re-solubilisation dudit(desdits) lyophilisat(s) dans une proportion allant de 1 à 2 gramme(s) de lyophilisat(s) pour 8 à 10 mL d'H₂O, est au moins égal à 4.

De préférence, ce pH ne dépasse pas le pH de 8.

Pour ce faire, on choisira de préférence une L-cystéine libre qui est sous une forme telle qu'elle présente un pH qui est au-dessus de 4 lorsqu'elle est en placée en solution. Par exemple, une solution contenant 1,25 gramme de cette forme de cystéine pour 50 mL d'H₂O présente un pH qui va de 4,5 à 5,5.

Un exemple préféré d'une telle forme de cystéine est la L-cystéine communément appelée L-cystéine base (ou L-cystéine sous forme base). Sous forme réduite, la L-cystéine base a pour formule HSCH₂CH(NH₂)CO₂H.

Les quantités de L-cystéine particulière conforme à l'invention et de cellules de *B. animalis lactis* contenues dans l'inoculum de l'invention sont réparties au sein de structures physiques solides, à savoir des granules congelés et/ou un(des) lyophilisat(s).

Ladite cystéine et ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* peuvent être contenues ensemble dans une même structure solide, ou bien être présentes dans des structures solides distinctes. Ces structures solides distinctes peuvent

elles-mêmes être conditionnées de manière séparée mais en collection, ou bien être en mélange.

Bien entendu, un mélange de structure solide commune, contenant à la fois de la L-cystéine particulière conforme à l'invention et des cellules de *B. animalis lactis*,
5 et de structures solides distinctes pourrait être réalisé.

Ladite cystéine et ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* peuvent donc être :

- ensemble au sein de mêmes granules congelés et/ou ou au sein d'un même lyophilisat, et/ou
10
- séparées, mais en collection (« kit-of-parts »), au sein de granules congelés distincts et/ou lyophilisat(s) distincts.

Ainsi, et selon un mode avantageux de réalisation de l'invention, tout ou partie de ladite L-cystéine particulière et des cellules de *B. animalis lactis* peuvent être ensemble au sein de mêmes granules congelés, ou au sein d'un même lyophilisat. L'inoculum de l'invention comprend alors au moins un granule congelé et/ou un lyophilisat, qui contient à la fois de la L-cystéine particulière conforme à l'invention et des cellules de *B. animalis lactis*.
15

De manière préférée, c'est l'ensemble des quantités de L-cystéine particulière et de cellules de *B. animalis lactis* contenues dans l'inoculum qui sont ensemble au sein de mêmes granules congelés, ou au sein d'un même lyophilisat.
20

Tout ou partie de ladite L-cystéine particulière conforme à l'invention et des cellules de *B. animalis lactis* peuvent être physiquement séparées, mais en collection (« kit-of-parts »), au sein de granules congelés distincts et/ou lyophilisat(s) distincts. L'inoculum de l'invention comprend alors :
25

- au moins deux granules congelés, ou
 - au moins deux lyophilisats distincts, ou
30
 - au moins un granulé congelé et au moins un lyophilisat,
- qui chacun contiennent soit de la cystéine particulière conforme à l'invention, soit des cellules de *B. animalis lactis*, de sorte que, pour chacune de ces paires d'entités physiques (granule + granule ; ou lyophilisat + lyophilisat distinct ; ou granule + lyophilisat):

- l'une des deux entités physiques contient tout ou partie de ladite L-cystéine particulière, sans contenir de cellules de *B. animalis lactis*, et
- l'autre des deux entités physiques qui contient des cellules de *B. animalis lactis*, sans contenir de ladite L-cystéine particulière.

5

Bien entendu, l'ensemble de la quantité de L-cystéine particulière conforme à l'invention et l'ensemble des cellules de *B. animalis lactis* contenues dans l'inoculum peuvent ainsi être contenues, ou se présenter sous la forme de granule(s) distinct(s) et/ou lyophilisat(s) distinct(s).

10

L'inoculum selon l'invention peut donc comprendre, ou être constitué des éléments suivants :

- a) granules congelés contenant L-cystéine particulière conforme à l'invention et cellules de *B. animalis lactis*,
- 15 b) lyophilisat contenant L-cystéine particulière conforme à l'invention et cellules de *B. animalis lactis*,
- c) granules congelés contenant de la L-cystéine particulière conforme à l'invention, mais pas de cellules de *B. animalis lactis*, et des granules congelés contenant des cellules de *B. animalis lactis* mais pas de L-cystéine particulière conforme à l'invention,
- 20 d) lyophilisat contenant de la L-cystéine particulière conforme à l'invention, mais pas de cellules de *B. animalis lactis*, et lyophilisat contenant des cellules de *B. animalis lactis* mais pas de L-cystéine particulière conforme à l'invention,
- 25 e) granules congelés contenant de la L-cystéine particulière conforme à l'invention, mais pas de cellules de *B. animalis lactis*, et lyophilisat contenant des cellules de *B. animalis lactis* mais pas de L-cystéine particulière conforme à l'invention,
- 30 f) lyophilisat contenant de la L-cystéine particulière conforme à l'invention mais pas de cellules de *B. animalis lactis*, et granules congelés contenant des cellules de *B. animalis*

lactis mais pas de L-cystéine particulière conforme à l'invention,

g) ou d'un mélange d'au moins deux des formulations présentées sous a) à f) ci-dessus.

5

L'inoculum selon l'invention contient de la cystéine dite sous forme libre (c'est-à-dire non liée à d'autres acides aminés par des liaisons peptidiques), qui résulte d'une sélection particulière opérée par les inventeurs.

En effet, ladite cystéine sous forme libre est une L-cystéine libre qui, en outre, est sous une forme telle qu'elle permet d'obtenir des granules et/ou lyophilisat(s) qui sont tels que le pH de la solution obtenue après :

- décongélation dudit(desdits) granule(s) (par exemple, en plaçant les granules au bain-marie à 37°C pendant 3 min sous agitation manuelle), et/ou
- re-solubilisation dudit(desdits) lyophilisat(s) dans une proportion allant de 1 à 2 gramme(s) de lyophilisat(s) pour 8 à 10 mL d'H₂O (par exemple, avec réhydratation pendant 30 min à 25°C sous agitation magnétique),

15

est au moins égal à 4.

Pour ce faire, on choisira de préférence une L-cystéine sous une forme telle que le pH d'une solution constituée de 1 à 1,5 gramme(s) de cette cystéine dans 50 à 100 mL d'H₂O est au moins égal à 4.

20

Un exemple d'une cystéine appropriée est la L-cystéine communément appelée L-cystéine base, dont la formule sous forme réduite est HSCH₂CH(NH₂)CO₂H.

Un exemple d'une cystéine non appropriée est la cystéine-HCl (chlorhydrate de cystéine, ou chlorhydrate monohydraté de cystéine).

25

De préférence, aucun des composés utilisés pour fabriquer l'inoculum selon l'invention n'est sous forme chlorhydratée.

La L-cystéine particulière conforme à l'invention qui est contenue dans l'inoculum de l'invention n'est pas une cystéine acide, telle que le chlorhydrate de L-cystéine (HSCH₂CH(NH₂)CO₂H•HCl) ou le chlorhydrate monohydraté de L-cystéine (HSCH₂CH(NH₂)CO₂H•HCl•H₂O).

30

Le chlorohydrate monohydraté de L-cystéine n'est pas une cystéine particulière conforme à l'invention, car une solution constituée de 1,0 g de chlorohydrate monohydraté de L-cystéine dans 100 mL d'H₂O a un pH de 1,5 à 2,0.

5 Ainsi, la décongélation de granules congelés, ou la re-solubilisation d'un lyophilisat, qui auraient(aurait) été produit(s) à partir d'une cystéine qui ne serait pas une cystéine particulière conforme à l'invention, conduirait à une solution dont le pH est très acide, plus particulièrement dont le pH est inférieur à 4, généralement inférieur à 3,5.

10 La plupart des cystéines sous forme très acide sont des cystéines sous forme de sels, telles que le chlorohydrate de L-cystéine, ou le chlorohydrate monohydraté de L-cystéine. Le ou les ions participant à ce sel se retrouvent dans le granulé congelé ou lyophilisat. La présence de cet ou ces ions peut donc parfois constituer un marqueur de l'utilisation d'une cystéine qui est combinée à une entité acide (laquelle a généralement pour fonction d'augmenter la solubilité de la cystéine). C'est par exemple le cas avec les ions chlore contenus dans le
15 chlorohydrate de L-cystéine, ou le chlorohydrate monohydraté de L-cystéine. En effet, si une cystéine acide du chlorohydrate de L-cystéine, ou du chlorohydrate monohydraté de L-cystéine, est utilisé, on peut constater que le granule ou le lyophilisat contient une forte quantité de chlorure (Cl), étant donné que le
20 chlorohydrate monohydraté de L-cystéine contient plus de 19% de chlorure, et que la L-cystéine base en contient en général moins de 0,05%, plus particulièrement moins de 0,040%. La présence forte de chlorure dans le granule ou le lyophilisat peut ainsi constituer un marqueur indirect de l'utilisation d'une cystéine qui n'est pas une cystéine base. Ainsi, la forme de cystéine utilisée dans un inoculum selon
25 l'invention apportera généralement moins de 60 microgrammes d'ions chlore par gramme de granules à 16-17% de matière sèche.

Ceci étant, le critère premier qui s'applique est celui du pH. La mesure du pH constitue en effet le critère direct de détection de la présence d'une cystéine
30 particulière conforme à l'invention: le pH des granules décongelés, ou du lyophilisat re-solubilisé, est alors au moins égal à 4. Il est en général au moins égal à 5, par exemple entre 5 et 6,5. De préférence, ce pH ne dépasse pas le pH de 8.

Un pH qui est au moins égal à 4 et au plus égal à 8 n'est pas stressant pour *B. animalis lactis*. *B. animalis lactis* peut alors être placé en mélange dans la solution de cystéine sans subir de stress, et être formulé en granules congelés ou lyophilisat qui intègre cystéine et cellules de *B. animalis lactis* au sein d'une
5 structure physique solide. L'inoculum de *B. animalis lactis* qui en résulte contient alors des cellules de *B. animalis lactis* qui sont en bon état physiologique et/ou métabolique, et qui répondent rapidement à l'activation exercée par la cystéine.
Un granule congelé ou un lyophilisat « intégré » de l'invention, qui contient à la fois des cellules de *B. animalis lactis* et de la L-cystéine particulière conforme à
10 l'invention, est donc un inoculum de *B. animalis lactis* particulièrement perfectionné, dans la mesure où il parvient à intégrer un activateur de *B. animalis lactis* dans sa structure, sans pour autant altérer l'état physiologique et/ou le métabolisme des cellules de *B. animalis lactis*.

15 La sélection de la L-cystéine particulière conforme à l'invention permet d'obtenir des granules et/ou lyophilisats qui sont plus efficaces que ne le seraient des granules et/ou lyophilisats formulés à partir de L-cystéine sous forme très acide, telle que du chlorohydrate de L-cystéine.

C'est également cette sélection qui permet d'intégrer la cystéine de manière
20 efficace au sein de mêmes granules congelés, ou au sein d'un même lyophilisat. En effet, lorsqu'on utilise de la cystéine sous forme très acide, telle que du chlorohydrate de L-cystéine, pour formuler un granule congelé ou un lyophilisat qui comprend à la fois cystéine-HCl et cellules de *B. animalis lactis*, le granule intégré ou le lyophilisat intégré résultant est un inoculum peu efficace de *B.*
25 *animalis lactis*, comparé au même granule ou lyophilisat obtenu à partir de L-cystéine particulière conforme à l'invention.

Selon un mode préféré de réalisation de l'invention, l'inoculum de l'invention de
comprend donc pas de cystéine très acide, et plus particulièrement pas de
30 chlorohydrate de L-cystéine, et/ou n'est pas fabriqué à partir d'une telle cystéine.

L'inoculum selon l'invention n'est pas non plus destiné à comprendre de la cystine. De préférence, on n'ajoutera donc pas de cystine dans l'inoculum de l'invention. Toutefois, des traces de cystine peuvent y être trouvées, mais elles

seraient le fait par exemple d'une oxydation de la cystéine contenue dans l'inoculum.

Avantageusement, ladite L-cystéine particulière conforme à l'invention est
5 présente dans l'inoculum en une quantité allant :

- de 1 gramme pour 1.10^{14} ufc de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*),
- à 1 gramme pour $3,5.10^{10}$ ufc de ladite au moins une souche de *B. animalis*
10 *lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*) ;

et/ou en une quantité allant :

- de 0,01 milligramme par milliard de ufc de ladite au moins une souche de *B.*
15 *animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*),
- à 30 milligrammes par milliard de ufc de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*).

Dans la présente demande, toutes les masses de cystéine sont calculées sur la
20 base d'une cystéine de formule $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$.

Préférentiellement, ladite L-cystéine particulière conforme à l'invention est présente dans ledit inoculum en une quantité allant :

- 25 - de 1 gramme pour $0,2.10^{14}$ ufc de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*).
 - à 1 gramme pour 10.10^{10} ufc de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*) ;
- et/ou en une quantité allant :

30

- de 0,05 milligramme par milliard de ufc de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*),
- à 10 milligrammes par milliard de ufc de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*).

Selon un mode particulier de réalisation de l'invention, ladite L-cystéine particulière conforme à l'invention est présente dans ledit inoculum en une quantité allant de 4,90 mg à 144 mg pour 5.10^9 à 5.10^{11} ufc de ladite au moins
5 une souche de *B. animalis lactis*.

Préférentiellement, ladite L-cystéine particulière conforme à l'invention est présente dans ledit inoculum en une quantité allant de 25 à 50 mg, plus
10 préférentiellement, de 30 à 40 mg, encore plus préférentiellement de 31 à 39 mg, par exemple environ 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 mg, très préférentiellement de 35 à 37 mg, par exemple environ 35, 36, 37 mg, de façon particulièrement préférée, environ 36,9 mg, pour 5.10^9 à 5.10^{11} ufc de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis*.

15 Préférentiellement, le nombre d'ufc de *B. animalis lactis* est de 5.10^9 à 5.10^{11} ufc, plus préférentiellement, de 2.10^{10} à 5.10^{11} ufc de *B. animalis lactis*, très préférentiellement, de 2.10^{10} à 1.10^{11} ufc de *B. animalis lactis*, encore plus préférentiellement, de 2.10^{10} à 7.10^{10} ufc de *B. animalis lactis*.

20 Avantageusement, 1 gramme de granules conformes à l'invention, qui comprendraient à 16-17% de matière sèche (matière sèche à 105°C pendant au moins 40 min), comprend de 5.10^9 à 5.10^{11} ufc de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis*.

Avantageusement, 1 gramme de granules conformes à l'invention, qui
25 comprendraient 16-17% de matière sèche (matière sèche à 105°C pendant au moins 40 min), comprend de 4,90 mg à 144 mg de ladite L-cystéine particulière conforme à l'invention, de préférence de L-cystéine base.

Avantageusement, une quantité de 160 à 170 milligrammes d'un lyophilisat
30 conforme à l'invention comprend de 5.10^9 à 5.10^{11} ufc de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis*.

Avantageusement, une quantité de 160 à 170 milligrammes d'un lyophilisat conforme à l'invention comprend de 4,90 mg à 144 mg de ladite L-cystéine particulière conforme à l'invention.

Pour dénombrer les colonies formant unité (ufc) de *B. animalis lactis*, on peut utiliser toute technique que la personne du métier trouverait appropriée, par exemple la méthode de numération des bifidobactéries décrite dans Grand *et al.* 2003 (Eur. Food Res. Technol. 217 : 90-92). De préférence, on utilise la méthode décrite dans S.N. Thitaram, G.R. Siragusa et A. Hinton, 2005 (Jr Letters in Applied Microbiology, Volume 41 Page 355 - October 2005; "*Bifidobacterium-selective isolation and enumeration from chicken caeca by a modified oligosaccharide antibiotic-selective agar medium*").

10

Pour doser la cystéine contenue dans un liquide, on peut utiliser toute technique que la personne du métier trouverait appropriée, par exemple la chromatographie en phase gazeuse couplée à une spectrométrie de masse, ou une chromatographie liquide haute performance couplée à une détection fluorimétrique. On peut également doser la cystéine à l'aide d'un analyseur d'acides aminés tels que le L-8800 *High Speed Amino Acid Analyzer* (Hitachi High Technologies).

20

De préférence, l'inoculum selon l'invention ne comprend pas plus de 0,5% (p/p) de levure, d'extrait de levure ou d'autolysat de levure.

Préférentiellement, l'inoculum selon l'invention ne comprend pas plus de 0,5% (p/p) de levure, d'extrait de levure ou d'autolysat de levure. Très préférentiellement, ledit inoculum ne contient pas de levure, d'extrait de levure ou d'autolysat de levure.

25

Avantageusement, l'invention permet de formuler un inoculum de *B. animalis lactis* qui est très actif, et qui génère une population de *B. animalis lactis* qui se maintient dans le temps (lors de la conservation du produit laitier fermenté à température réfrigérée), sans que l'on ait à utiliser de conservateur dans l'inoculum, et sans que l'on ait à ajouter un conservateur dans le substrat laitier, ou dans le produit laitier fermenté.

30

Grâce à l'invention, la population de *B. animalis lactis* se trouve dans le produit laitier fermenté dans un état physiologique et/ou métabolique particulièrement sain. qui lui permet de se maintenir à un fort niveau.

L'inoculum de l'invention comprend au moins une souche de *B. animalis lactis*, par exemple la souche I-2494 ou la souche BB12® de Chr. Hansen.

L'inoculum de l'invention peut bien sûr comprendre plusieurs souches de *B. animalis lactis*, par exemple la souche I-2494 et la souche BB12® de Chr. Hansen.

L'inoculum selon l'invention peut en outre comprendre au moins une souche de bactérie lactique autre que *B. animalis lactis*.

10 Ladite au moins une autre souche de bactérie lactique peut être présente au sein des granules ou lyophilisat(s) qui contiennent des cellules de *B. animalis lactis* et/ou de la L-cystéine particulière conforme à l'invention.

Ladite au moins une autre souche de bactérie lactique peut être présente dans une structure physique distincte de celle qui contient les cellules de *B. animalis lactis*. Cette structure physique distincte peut par exemple être une structure solide, telle que des granules congelés ou un lyophilisat, qui sont en mélange avec les granules et/ou lyophilisat(s) de *B. animalis lactis* et L-cystéine particulière conforme à l'invention, ou qui en sont séparés mais en collection (« kit-of-parts »). Cette au moins une autre souche de bactérie lactique peut par exemple être présente sous forme de granules congelés, ou d'un lyophilisat, qui sont distincts(distinct) des granules ou lyophilisat(s) de *B. animalis lactis* et de cystéine particulière conforme à l'invention.

Cette au moins une autre souche de bactérie lactique peut être une souche de *Bifidobacterium*, ou une souche d'un genre différent.

25 Cette souche de genre différent peut être une souche à fonction probiotique, par exemple au moins une souche choisie par les souches de *Lactobacillus acidophilus*, *Mactobacillus thamnusus*, *Lactobacillus casei*.

Cette souche de genre différent peut être une souche à fonction technique, telle que *S. thermophilus* et/ou *L. bulgaricus*.

30 Avantageusement, ledit inoculum selon l'invention comprend, en sus des granule(s) et/ou lyophilisat(s) de *B. animalis lactis* et L-cystéine particulière, un inoculum de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*, par exemple sous forme de granule(s) congelé(s) et/ou lyophilisat(s), adaptés à l'ensemencement direct.

De manière préférentielle, l'inoculum selon l'invention comprend plusieurs souches autres que *B. animalis lactis*, par exemple au moins deux, au moins trois, au moins quatre souches autres que *B. animalis lactis*.

Avantageusement ces autres souches sont au moins une souche de *S. thermophilus* (par exemple, la souche I-1630 disponible auprès de la CNCM), et
5 au moins deux souches de *L. bulgaricus* (par exemple, les souches I-1632 et I-1519 disponibles auprès de la CNCM). Un tel inoculum peut se présenter sous la forme d'un mélange ou d'une collection « kit-of-parts » de granules congelés et/ou lyophilisat(s) contenant *B. animalis lactis* et L-cystéine particulière conforme à
10 l'invention, et de granules congelés et/ou lyophilisat(s) contenant *S. thermophilus* et/ou *L. bulgaricus*. L'ensemble est alors spécialement adapté à l'ensemencement direct d'un substrat laitier, en vue de sa transformation par fermentation lactique acidifiante symbiotique *S. thermophilus*-*L. bulgaricus* et par fermentation de *B. animalis lactis*, en un lait fermenté qui est à haute valeur probiotique, et qui
15 maintient sa haute valeur probiotique lors de sa conservation en milieu réfrigéré.

La présente demande est également relative à un granule intégré selon l'invention en tant que tel, ainsi qu'à un lyophilisat intégré selon l'invention en tant que tel.

Comme indiqué et décrit ci-dessus, et/ou en partie exemples ci-dessous, un
20 granule ou lyophilisat intégré selon l'invention comprend au moins une souche de *B. animalis lactis* et de la L-cystéine particulière conforme à l'invention, dans les doses et/ou proportions indiquées. De préférence, un tel granule ou lyophilisat ne comprend pas de cystéine sous forme très acide, telle que du monochlorate de L-cystéine.

25 La présente demande est ainsi relative à un granule congelé, qui comprend au moins une souche de *B. animalis lactis*, et de la L-cystéine qui est non liée à d'autres acides aminés par liaison peptidique, ladite L-cystéine étant sous une forme telle que le pH de la solution obtenue après décongélation dudit(desdits) granule(s) est au moins égal à 4, généralement supérieur à 5.

30 La présente demande est ainsi relative à un lyophilisat, qui comprend au moins une souche de *B. animalis lactis*, et de la L-cystéine qui est non liée à d'autres acides aminés par liaison peptidique, ladite L-cystéine étant sous une cystéine sous une forme telle que le pH de la solution obtenue après re-solubilisation dudit(desdits) lyophilisat(s) dans une proportion allant de 1 à 2 gramme(s) de

lyophilisat(s) pour 8 à 10 mL d'H₂O, est au moins égal à 4, généralement supérieur à 5.

De préférence, le pH de granule ou lyophilisat est inférieur à 8 (pH de la solution obtenue après décongélation du granule, ou re-solubilisation du lyophilisat).

5

L'invention est également relative aux utilisations de l'inoculum selon l'invention.

L'invention est plus particulièrement relative à ses utilisations dans le cadre d'une fermentation lactique acidifiante, encore plus particulièrement à ses utilisations dans le cadre de la fabrication de produits laitiers fermentés destinés à la

10

consommation humaine.

L'invention est ainsi relative à tout procédé qui met en œuvre au moins un inoculum et/ou au moins un granule ou lyophilisat selon l'invention.

15

L'invention vise plus particulièrement un procédé de stimulation de la croissance et/ou du métabolisme de *B. animalis lactis* sur substrat laitier, qui met en œuvre au moins un inoculum et/ou au moins un granule et/ou au moins un lyophilisat selon l'invention.

Ce procédé de stimulation présente l'avantage de stimuler *B. animalis lactis* de manière très efficace. Comme ci-dessus présenté, et comme ci-dessous illustré, le procédé de stimulation selon l'invention permet de produire une population de *B. animalis lactis* dont le métabolisme et/ou la croissance permettent un maintien de cellules vivantes de *B. animalis lactis* au cours du temps.

20

Pour mettre en œuvre ce procédé, on apporte ledit inoculum dans des doses et/ou proportions telles qu'indiquées ci-dessus et/ou décrites dans les exemples et les figures qui suivent.

25

Avantageusement, on apporte ledit inoculum et/ou granule et/ou lyophilisat selon l'invention dans des quantités qui apportent au substrat laitier :

30

- 5 à 20 mg de cystéine par L de substrat laitier, préférentiellement, de 6 à 15 mg/L, plus préférentiellement de 7 à 11 mg/L,

et

- 10^9 à 10^{11} ufc de *B. animalis lactis* par L de substrat, de préférence, de $0,4 \cdot 10^{10}$ à $1 \cdot 10^{11}$ ufc de *B. animalis lactis*, plus préférentiellement, de $0,4 \cdot 10^{10}$ à $1,2 \cdot 10^{10}$

ufc de *B. animalis lactis*, très préférentiellement, de $0,4 \cdot 10^{10}$ à $1 \cdot 10^{10}$ ufc de *B. animalis lactis*.

Le substrat inoculé est de préférence maintenu dans des conditions de température et d'atmosphère favorables au métabolisme de *B. animalis lactis*, par exemple de 37°C à 42°C, dans un récipient clos).

L'invention vise également un procédé de production d'un produit laitier fermenté, préférentiellement d'un produit laitier obtenu par fermentation lactique, laquelle fermentation lactique comprenant au moins la fermentation symbiotique *S. thermophilus* – *L. bulgaricus*, en sus de la fermentation opérée par *B. animalis lactis*

Le procédé de l'invention comprend la mise en œuvre d'au moins un inoculum et/ou au moins un granule et/ou au moins un lyophilisat selon l'invention. Le produit laitier fermenté obtenu est un produit laitier fermenté à haute valeur probiotique, car il contient une forte teneur en *B. animalis lactis*, et conserve une teneur haute lors de conservation en atmosphère réfrigérée.

Ce procédé de production présente l'avantage d'activer et/ou de stimuler *B. animalis lactis* de manière très efficace. Il présente également l'avantage de ne pas exercer d'effet négatif sur la symbiose *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*.

Comme ci-dessus présenté, et comme ci-dessous illustré, le procédé de selon de production l'invention permet de produire une population de *B. animalis lactis* dont le métabolisme et/ou la croissance permettent un maintien de cellules vivantes de *B. animalis lactis* au cours du temps.

Pour mettre en œuvre ce procédé, on apporte ledit inoculum dans des doses et/ou proportions telles qu'indiquées ci-dessus et/ou décrites dans les exemples et les figures qui suivent.

Avantageusement, on apporte ledit inoculum et/ou granule et/ou lyophilisat selon l'invention dans des quantités qui apportent au substrat laitier :

- 5 à 20 mg de cystéine par L de substrat laitier, préférentiellement, de 6 à 15 mg/L, plus préférentiellement de 7 à 11 mg/L,

et

- 10^9 à 10^{11} ufc de *B. animalis lactis* par L de substrat, de préférence, de $0,4 \cdot 10^{10}$ à $1 \cdot 10^{11}$ ufc de *B. animalis lactis*, plus préférentiellement, de $0,4 \cdot 10^{10}$ à $1,2 \cdot 10^{10}$

ufc de *B. animalis lactis*, très préférentiellement, de $0,4.10^{10}$ à 1.10^{10} ufc de *B. animalis lactis*.

Des doses de 0,05 g à 1 gramme de granules intégrés selon l'invention, par
5 exemple d'environ 0,2 g de granules intégrés selon l'invention, sont des exemples
de doses appropriées pour 1 litre de substrat laitier.

Le substrat inoculé est de préférence maintenu dans des conditions de
température et d'atmosphère favorables au métabolisme de *B. animalis lactis*, par
10 exemple de 37°C à 42°C, dans un récipient clos).

Ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* tient le rôle de souche
probiotique. Ceci étant, cette au moins une souche de *B. animalis lactis* doit
pouvoir, elle aussi, mener une fermentation acidifiante du substrat laitier. Ladite
au moins une souche de *B. animalis lactis* n'est donc pas simplement ajoutée
15 dans le substrat ou produit laitier sans qu'on lui permette de mener une
fermentation acidifiante, comme le serait un simple additif.

Avantageusement, le procédé de production de produit laitier fermenté peut
comprendre la mise en œuvre d'au moins une souche autre que ladite au moins
20 une souche de *B. animalis lactis*.

Cette autre souche est de préférence une souche de bactérie lactique.

Ladite au moins une autre souche de bactérie lactique a notamment pour fonction
de mener une fermentation lactique acidifiante. Elle est donc inoculée dans le
substrat laitier de sorte à pouvoir conduire une fermentation lactique acidifiante,
25 c'est-à-dire à un moment et dans des quantités qui lui permettent d'effectivement
mener une fermentation lactique acidifiante.

Le procédé de fermentation de l'invention correspond donc à une fermentation
mixte menée par ladite au moins une souche de bactérie lactique et par ladite au
moins une souche de *B. animalis lactis*, et non à un simple procédé de
30 fermentation lactique dans lequel *B. animalis lactis* serait ajouté comme un simple
additif sans action fermentaire détectable.

Ladite au moins une souche de bactérie lactique et ladite au moins une souche
de *B. animalis lactis* se trouvent donc ensemble dans le substrat laitier.

Selon un aspect avantageux de l'invention, le procédé de production peut ainsi ne pas être un procédé dit à deux étapes (« two-step process ») : l'ajout de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* et des éventuelles autres souches de bactéries lactiques peut être réalisé en même temps, ou à tout le moins sensible
5 à la même étape du procédé, à savoir au début du procédé, sans avoir à attendre et à contrôler que la fermentation menée par une des souches soient parvenues à un certain stade, pour décider d'ajouter la ou les autres souches.

La fermentation du substrat laitier est menée à une température appropriée aux
10 souches mises en œuvre, et est généralement menée à une température comprise entre 36°C et 42°C.

Cette fermentation est généralement menée jusqu'à l'obtention d'un pH compris entre 4,8 et 4,2.

15 Le procédé de production de produit laitier fermenté selon l'invention peut par ailleurs comprendre une ou plusieurs autres étapes, par exemple une ou plusieurs autres étapes choisies parmi les étapes classiques de production de produit laitier fermenté concerné.

Il peut par exemple s'agir d'une ou plusieurs étapes parmi les étapes suivantes :

- 20 - la préparation d'un substrat laitier,
- le traitement thermique du substrat laitier (traitement thermique au moins équivalent à la pasteurisation, par exemple 95°C pendant 5 min),
- une ou plusieurs inoculations du substrat laitier,
- la conduite d'au moins une fermentation lactique du substrat inoculé dans
25 des conditions adaptées aux souches inoculées (jusqu'à un pH de 4,8 à 4,2 généralement),
- éventuellement l'ajout d'arômes, de fruits, d'édulcorants, de colorants, de conservateurs,
- éventuellement, le lissage ou le brassage du produit fermenté,
- 30 - le conditionnement du produit fermenté, par exemple dans des récipients hermétiques,
- la conservation du produit laitier fermenté en milieu réfrigéré.

L'inoculum selon l'invention permet ainsi d'obtenir une population de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*), qui est d'au moins 5.10^7 ufc par gramme de produit fermenté en fin de fermentation, de préférence d'au moins 10^8 ufc par gramme de produit fermenté en fin de fermentation.

De manière remarquable, l'inoculum selon l'invention présente l'avantage de permettre d'obtenir une population de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*), qui ne descend pas au-dessous de 5.10^7 ufc par gramme de produit fermenté, après au moins 20 jours, de préférence au moins 30 jours de conservation dudit produit fermenté à une température comprise entre 4 et 11°C, de préférence à une température comprise entre 4 et 10°C, très préférentiellement à une température comprise entre 4 et 9°C.

De manière particulièrement remarquable, l'inoculum selon l'invention présente l'avantage de permettre d'obtenir une population de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*), qui ne descend pas au-dessous de 10^8 ufc par gramme de produit fermenté, après au moins 20 jours, de préférence au moins 30 jours de conservation dudit produit fermenté à une température comprise entre 4 et 11°C, de préférence à une température comprise entre 4 et 10°C, très préférentiellement à une température comprise entre 4 et 9°C : cf. Figures 8 et 9, illustrant le maintien jusqu'à au moins 30 jours de conservation à 10°C de la population de *B. animalis lactis* dans des laits fermentés produits à l'aide d'un inoculum conforme à l'invention (*S. thermophilus*-*L. bulgaricus* + *B. animalis lactis*), par comparaison aux laits fermentés témoins, dont la population de *B. animalis lactis* chute rapidement à compter du 21^{ème} jour.

Dans la présente demande, les masses de produit laitier fermenté s'entendent comme étant la masse de la partie lactée du produit laitier fermenté.

La présente demande est également relative au produit laitier fermenté en tant que tel.

Un tel produit présente une population de *B. animalis lactis* qui se maintient au-dessus de celles observées dans les produits de l'art antérieur, même après au

moins 20 jours, de préférence au moins 30 jours de conservation dudit produit fermenté à une température comprise entre 4 et 11°C, de préférence à une température comprise entre 4 et 10°C, très préférentiellement à une température comprise entre 4 et 9°C.

- 5 Sa composition diffère donc nécessairement des produits de l'art antérieur.

La présente demande est donc relative à un produit laitier fermenté, qui est susceptible d'être obtenu par fermentation lactique d'un substrat laitier par au moins un inoculum selon l'invention jusqu'à un pH généralement compris entre 4,8 et 4,2. De préférence, cet inoculum est sous la forme de granules congelés
10 intégrés et/ou d'un lyophilisat intégré selon l'invention (inoculum dans lequel la L-cystéine particulière est intégrée au ferment *B. animalis lactis*). Avantageusement, cet inoculum peut en outre comprendre au moins une souche de *S. thermophilus* et/ou au moins une souche de *L. bulgaricus*.

- 15 Dans la présente demande, l'acronyme CNCM désigne la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM ; Institut Pasteur ; 25, rue du Docteur Roux ; F-75724 PARIS CEDEX 15). Les souches déposées auprès de la CNCM porte un numéro commençant par « I », tel que « I-2494 » (souche de *B. animalis lactis*), « I-1630 » (souche de *S. thermophilus*), « I-1632 » ou « I-1519 » (souches
20 de *L. bulgaricus*).

Le terme "comprenant", avec lequel "incluant" ou "contenant" est synonyme, est un terme ouvert, et n'exclut pas la présence d'un ou plusieurs élément(s), ingrédient(s) ou étape(s) de méthode additionnel(s) qui ne serait(seraient) pas
25 explicitement indiqué(s), tandis que le terme "consistant" ou "constitué" est un terme fermé, qui exclut la présence de tout autre élément additionnel, étape, ou ingrédient qui ne serait pas explicitement exposé. Le terme "consistant essentiellement" ou "essentiellement constitué" est un terme partiellement ouvert, qui n'exclut pas la présence d'un ou plusieurs élément(s), ingrédient(s) ou
30 étape(s) additionnel(s), dans la mesure où ce(s) élément(s), ingrédient(s) ou étape(s) additionnel(s) n'affecte(nt) pas matériellement les propriétés de base de l'invention.

Par conséquent, le terme "comprenant" (ou "comprend(comprennent)") inclut les termes "consistant", "constitué", aussi bien que les termes "consistant essentiellement" et "essentiellement constitué".

- 5 Le contenu de chacun des documents, ouvrages, ou publications qui sont cités dans la présente demande est incorporé par référence.

Les exemples qui suivent sont données à titre purement illustratif, et ne limitent l'invention en aucune façon.

10

EXEMPLES

Exemple 1 : L'utilisation de cystéine-HCl n'est pas adaptée à la fabrication de granules dits « intégrés » qui comprendraient à la fois cystéine et *B. animalis lactis*

15

Matériel et méthode :

Dans cet exemple, on suit le principe de fabrication de granules présenté en Figure 2.

20

Les souches probiotiques utilisées dans cet exemple sont les suivantes :

- *Bifidobacterium animalis lactis* souche BB12® commercialisée par Chr. Hansen A/S, Hoersholm, Danemark
- *Bifidobacterium animalis lactis* souche I-2494 disponible auprès de la
25 CNCM (date de dépôt auprès de la CNCM = 20 juin 2000) ; cf. demande internationale WO 02/02800 déposée le 4 juillet 2001 au nom de Compagnie Gervais Danone, ainsi que les contreparties nationales et régionales de cette demande internationale, plus particulièrement, pour ce qui concerne les contreparties US de cette demande internationale, voir
30 notamment le brevet US 7,008,785 B2.

Le cas échéant, les souches sont décongelées avant utilisation.

La cystéine utilisée est la cystéine-HCl, qui est habituellement utilisée à titre d'apport en cystéine, du fait de sa très bonne solubilité (environ 110g pour 100g d'H₂O à 20°C).

La cystéine-HCl est de l'hydrochlorate monohydraté de L-cystéine (ou, 5 monochlorohydrate monohydraté d'acide (R)-2-amino-3-mercaptopropionique). Elle a pour formule C₃H₇NO₂S•HCl•H₂O (ou, L-cystéine•HCl•H₂O). Son numéro CAS est 7048-04-6 ; elle a une masse molaire de 175,63.

La cystéine-HCl est disponible dans le commerce, par exemple auprès de Ajinomoto Aminoscience LLC, Raleigh NC 27610, USA.

10

Procédé de production de granules (cf. Figure 2) :

50 grammes de chaque souche de *B. animalis lactis* sont mélangés à :

- 15 grammes de cystéine-HCl à 325 g/L (granules intégrés G4I Cys-HCl), ou à
- 15 grammes d'eau (granules témoins I-2494 T et BB12 T).

15 Le mélange se fait sous agitation de sorte à bien incorporer la solution de cystéine-HCl (ou l'eau dans le cas des témoins).

La formation de granules congelés se fait par gouttage du mélange dans de l'azote liquide. Un dispositif comprenant plusieurs aiguilles de seringue, 20 raccordées via un tuyau à une pompe péristaltique, est alimenté en mélange et laisse tomber les gouttes formées à la sortie des aiguilles dans un bac isotherme rempli d'azote liquide.

On obtient ainsi des granules congelés de ferment probiotique G4I Cys-HCl (granules de *B. animalis lactis* I-2494 ou BB12®, contenant de la cystéine-HCL), 25 et des granules témoins contenant de l'eau en lieu et place de la cystéine-HCl.

Préparation des mix laitiers (= substrats laitiers) :

Le mix laitier est composé des ingrédients suivants : du lait écrémé à 0% de 30 matières grasses, de la crème à 40% de matières grasses et de la poudre de lait écrémé (PLE) à 33% de protéines.

Dans un premier temps, tous les ingrédients sont associés ensemble afin de standardiser le lait à un taux de protéique (TP) de 4,4%, un taux de matières grasses (MG) de 3,5% et taux de matières sèches de 15,8% avec agitation du

milieu pendant 60 minutes à environ 750 tours/min avec un agitateur HEIDOLPH® afin que les protéines se réhydratent.

Le contrôle de la standardisation est effectué au détecteur infrarouge MILKOSCAN FT 120® de la société FOSS®. Ci-dessous, un exemple des

5 quantités nécessaires de chaque ingrédient pour obtenir les cibles caractérisant le lait.

Tableau 1 :

Ingrédients	En %
Lait écrémé 0% MG	87,5
Crème à 40% MG	8,7
Protéines de lait écrémé 33% TP	3,8
TOTAL	100

10

Le lait est alors chauffé à une température de 50°C à 60°C afin de bien fondre les globules de gras. Une fois la température atteinte, les 10 litres sont homogénéisés au MICROFLUIDIIZIER®. Ceci permet de casser les globules gras en passant le lait en capillaires à travers une grille et sous une pression de 350

15 Bars.

Un bain-marie de la société MEMMERT® est préparé et réglé à 103°C. Le lait est transféré dans 8 bouteilles de 1 litre, avec une pesée précise de cette quantité pour chaque bouteille.

Les bouteilles sont immergées jusqu'au bas du col dans le bain-marie à 103°C

20 pendant 35 minutes, puis 10 minutes à 95°C dans le même bain-marie.

Les bouteilles sont refroidies dans un bain d'eau froide en flux continu, puis stockées à 4°C au réfrigérateur de 12 à 24 heures jusqu'à utilisation.

Inoculation des mix laitiers :

25 Les bouteilles de lait sont sorties du réfrigérateur 45 minutes avant l'inoculation des ferments et placées en bain-marie à la température de fermentation (37°C).

Quatre inoculations distinctes de mix laitier sont réalisées :

- granules I-2494 G4I Cys-HCl,

- granules témoins I-2494 T,
- granules BB12 G4I Cys-HCl,
- granules témoins BB12 T.

5 Chaque inoculation est réalisée à hauteur de 0,2 gramme de granules par litre de mix laitier.

Les bouteilles sont replongées dans le bain-marie (37°C), et l'évolution du pH est suivie au cours du temps (appareil CINAC® de la société YSEBAERT®).

Résultats :

10

Pour *B. animalis lactis* I-2494, tout comme pour *B. animalis lactis* BB12®, on observe une dégradation de l'état physiologique du probiotique du fait de la présence de cystéine-HCl dans les granules (temps physiologique = temps nécessaire aux bactéries pour abaisser le pH de 0,08 unité pH ; ce qui donne une

15

mesure de la reprise de l'activité métabolique de ces bactéries). Ces résultats sont illustrés par la Figure 3 (I-2494 G4I, comparé à I-2494 T).

L'activité du probiotique *B. animalis lactis* est très affectée par l'ajout de cystéine-HCl dans les granules de probiotique (augmentation du Ta).

20

La cystéine-HCl n'est pas pas une source de cystéine satisfaisante pour la fabrication de granules intégrés, qui comprennent *B. animalis lactis* et cystéine dans les mêmes granules, et qui sont destinés à la fabrication de produits laitiers fermentés à haute valeur probiotique.

25

La solution intégrée (granules *B. animalis lactis* + cystéine) ne peut être mise en œuvre avec de la cystéine-HCl, car elle rend le ferment probiotique impropre à une activité métabolique correcte.

30

Au vu de ces résultats, il peut être observé que le pH d'une solution de cystéine-HCl est inférieur à 3,5 ; plus particulièrement, le pH d'une solution de cystéine-HCl à 1g dans 100 mL d'H₂O est de 1,5 à 2,0, et que le probiotique *B. animalis lactis* est particulièrement sensible aux pH bas, même lorsque les temps de contact sont réduits.

Il convient donc d'identifier une source de cystéine assimilable par *B. animalis lactis*, adaptée à la consommation humaine, et qui présente en solution un pH non stressant pour *B. animalis lactis*.

Exemple 2 : La sélection d'une L-cystéine base permet de parvenir à produire des granules « intégrés » très efficaces, malgré les problèmes liés à la faible solubilité de cette forme de cystéine

5

On procède de manière comparable à ce qui a été décrit en exemple 1 ci-dessus, mais en sélectionnant de la L-cystéine base (L-cystéine ; $C_3H_7NO_2S$; numéro CAS : 52-90-4 ; masse molaire : 121,16), en lieu et place de la cystéine-HCl.

10 De la L-cystéine base est notamment disponible auprès de Ajinomoto Aminoscience LLC, Raleigh NC 27610, USA.

La solubilité de cette cystéine base est de 16 g pour 100g d' H_2O à 20°C.

Le pH d'une solution contenant 1,15 g de cystéine base pour 50mL d' H_2O est de 4,5 à 5,5.

15

On prépare une solution mère de cystéine base à 160 g/L, et l'on mélange 3 grammes de cette solution mère, à 10 grammes de ferment *B. animalis lactis* (*B. animalis lactis* souche I-2494 ou souche BB12®), que l'on formule sous forme de granules congelés (I-2494 G4I Cys-base ; et BB12 G4I Cys-base), comme décrit dans l'exemple 1 ci-dessus.

20

Des granules témoins I-2494 T et BB12 T sont préparés en utilisant 3 grammes d'eau, en lieu et place de la cystéine base.

Le schéma de fabrication de ces granules est présenté en figure 4.

25 Quatre inoculations distinctes de mix laitier sont réalisées à hauteur de 0,2 g/L, comme décrit en exemple 1 ci-dessus.

La quantité de cystéine base contenue dans les granules G4I est donc ici de :

$(160 \times 3) / (3 + 10) = 36,92$ milligrammes de cystéine base par gramme de granules congelés G4I.

30

Dans cet essai, la teneur en *B. animalis lactis* est d'environ $2 \cdot 10^{10}$ ufc par gramme de granules congelés G4I ou G4 (I-2494 ou BB12).

Il y a donc ici apport de 1,85 mg de cystéine $C_3H_7NO_2S$ par milliard d'ufc de ferment *B. animalis lactis*.

La quantité de cystéine base apportée dans le mix laitier par les granules G4I inoculé à 0,2 g/L est de $0,2 \times 36,92 = 7,384$ mg de cystéine par litre de mix laitier.

Les résultats des incubations des mix à 37°C montrent que la sélection de cystéine base permet d'éviter que l'état physiologique du ferment probiotique ne se dégrade dans une trop grande mesure.

Ces résultats sont illustrés par la Figure 5 (souche I-2494).

La méthode « granules à cystéine intégrée » (granules *B. animalis lactis* + cystéine) peut être mise en œuvre avec de la L-cystéine base, car *B. animalis lactis* conserve alors une activité métabolique correcte.

Exemple 3 : Performance du système intégré G4I Cys-base, d'une part par rapport au système combiné G4 (granules de cystéine distincts des granules de ferment probiotique), et d'autre part par rapport au système témoin (granules T, sans cystéine).

Dans cet exemple, on utilise des granules de ferment *B. animalis lactis* produits comme décrits en exemple 2, à savoir :

- des granules BB12 T (granules témoins, contenant *B. animalis lactis* BB12® + eau),
- des granules BB12 G4I (granules intégrés, contenant *B. animalis lactis* BB12® + L-cystéine base, à raison d'environ 1,85 mg de L-cystéine $C_3H_7NO_2S$ par milliard d'ufc de ferment probiotique),
- des granules I-2494 T (granules témoins, contenant *B. animalis lactis* I-2494 + eau), et
- des granules I-2494 G4I (granules intégrés, contenant *B. animalis lactis* I-2494 + L-cystéine base, à raison d'environ 1,85 mg de cystéine $C_3H_7NO_2S$ par milliard d'ufc de ferment probiotique).

Dans cet exemple, on utilise également des ferments dits techniques, qui sont des ferments de *S. thermophilus* et de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

Les ferments techniques ici utilisés correspondent à un mélange de trois souches techniques, à savoir la souche I-1630 de *S. thermophilus* et aux souches I-1632 et I-1519 de *L. bulgaricus* (souches disponibles auprès de la CNCM).

Les ferments techniques sont apportés sous forme de granules congelés.

- 5 Les ferments techniques sont inoculés dans le mix laitier à hauteur d'environ 1.10^6 ufc de *S. thermophilus* I-1630, et d'environ $2,7.10^5$ ufc de *L. bulgaricus* (avec 5% de la souche I-1632 et 95% de la souche I-1519) par gramme de substrat laitier.
- 10 Six mix laitiers sont préparés comme décrits en exemple 1, et inoculés comme suit :
 - mix BB12 T et mix I-2494 T : mix témoins, inoculés par un mélange de granules de ferments techniques et de granules BB12 T ou I-2494 T, respectivement (granules contenant le probiotique *B. animalis lactis* sans cystéine) ;
 - 15 - mix BB12 G4 et mix I-2494 G4 : mix de la méthode « combinée », inoculés comme les mix témoins, et dans lesquels on ajoute en outre des granules de cystéine congelés ;
 - mix BB12 G4I et mix I-2494 G4I : mix de la méthode « intégrée », inoculés par un mélange de granules de ferments techniques et de granules BB12 G4I ou I-20 2494 G4I, respectivement (granules de *B. animalis lactis* contenant la cystéine sous forme intégrée).

Les mix sont inoculés à raison de 0,5 g/L de mélange de granules (0,3 g/L de ferments techniques, et 0,2 g/L de granules de ferment probiotique *B. animalis* 25 *lactis*).

Les granules de cystéine des mix G4 sont ajoutés, de sorte à apporter 7,5 mg/L de cystéine dans le mix, c'est-à-dire une quantité de cystéine comparable à celle apportée par les granules G4I (valeur calculée de 7,384 mg/L de cystéine ; cf. 30 exemple 2 ci-dessus).

Les six mix inoculés sont placés en incubation à 37°C, comme décrit en exemple 1.

La bouteille est refroidie et stockée à 20°C. Puis, le décaillage de la bouteille se fait à la main.

Le conditionnement se fait manuellement en pots de 125 ml et l'opercule est thermoscellé avec la thermoscelleuse DNV-100-25 PPV-A® de la société FESTO®. Les produits sont stockés en chambre froide de 10°C pour toute la durée de l'essai.

5

On mesure le pH au cours du temps de fermentation, ainsi que l'évolution de la biomasse (UFC/mL en fonction du nombre de jours) au cours de la conservation du produit laitier à 10°C.

Les résultats sont illustrés par les figures 6 à 9.

10

La souche BB12 de *B. animalis lactis* donne des résultats tout à fait comparables à ceux de la souche I-2494.

En figures 6 et 7 (évolution du pH en fonction du temps en heures), on observe que la présence de cystéine induit une différence de Vmax, par rapport au mix témoin. L'effet cystéine est ainsi visible sur la cinétique d'acidification de *B. animalis lactis*.

15

On observe également que les mix G4I (L-cystéine base intégrée dans les granules de *B. animalis lactis*) donnent une cinétique tout à fait comparable à celle des mix G4 (granules de L-cystéine base distincts des granules de *B. animalis lactis*). L'intégration de l'activateur de croissance est donc parfaitement réussie.

20

En tableaux 2 et 3 ci-dessus, sont présentées les valeurs de quelques paramètres des cinétiques d'acidification présentés en Figures 6 et 7.

25 Tableau 2 (cinétiques d'acidification BB12 de la figure 6) :

Ferments techniques avec	Ta	Vmax	pHm	Tmax	pH0	TpH5,5	TpH5
BB12 T	105	-0,0069	5,97	196	6,43	277	417
BB12 G4	100	-0,0094	5,88	216	6,54	289	425
BB12 G4I	102	-0,0096	5,88	218	6,55	288	423

Tableau 3 (cinétiques d'acidification I-2494 de la figure 7) :

Ferments techniques avec	Ta	Vmax	pHm	Tmax	pH0	TpH5,5	TpH5
--------------------------	----	------	-----	------	-----	--------	------

I-2494T	97	-0,0060	6,13	185	6,52	309	489
I-2494 G4	95	-0,0095	5,87	218	6,53	290	418
I-2494 G4I	98	-0,0092	5,88	219	6,54	289	419

- 5

Ta

Vmax

pHm

Tmax

pH0

TpH5,5

TpH5

temps de latence (en min)

vitesse maximale (en unités pH / min)

pH à la vitesse maximale d'acidification

temps pour arriver à Vmax (en min)

pH en début de fermentation

temps pour arriver à pH 5,5 (en min)

temps pour arriver à pH 5 (en min)

10 Les figures 8 et 9 présentent quant à elles l'évolution de la population cellulaire du ferment probiotique *B. animalis lactis* BB12 en Figure 8, et *B. animalis lactis* probiotique I-2494 en Figure 9, au cours de la conservation du produit laitier fermenté (symbiose *S. thermophilus*-*L. bulgaricus*, en sus de *B. animalis lactis*) à une température de 10°C.

15 Ces courbes de population cellulaire confirment les résultats observés par le biais des cinétiques d'acidification présentées en figures 6 et 7.

La présence de L-cystéine stimule très nettement la population cellulaire en probiotique, et l'intégration de L-cystéine base est parfaitement réussie pour chacune des deux souches de *B. animalis lactis* représentées.

20 Ainsi, par rapport au système « combiné » G4 [granules de ferment probiotique *B. animalis lactis*+ granules distincts de L-cystéine base], les granules « intégrés » G4I de L-cystéine base sont tout aussi efficaces : ils permettent de conduire une fermentation lactique symbiotique (*S. thermophilus* + *L. bulgaricus*) qui est d'au

25 moins aussi bonne qualité, et permettent de générer une population cellulaire de ferment probiotique *B. animalis lactis* qui est de taille tout à fait comparable, et qui se maintient aussi longtemps au cours du temps lors de la conservation dulait fermenté.

La sélection de L-cystéine base a donc permis d'aboutir à une intégration réussie

30 d'activateur de croissance spécifique de *B. animalis lactis*.

- 5 Les granules « intégrés » G4I contenant ferment probiotique *B. animalis lactis* et L-cystéine base, et les granules « combinés » G4 (granules de L-cystéine base distincts des granules de probiotique) sont bien plus efficaces que le système témoin sans cystéine (granules T) : ils permettent de conduire une fermentation lactique symbiotique (*S. thermophilus* + *L. bulgaricus*) de qualité au moins comparable, tout en générant une population cellulaire de ferment probiotique *B. animalis lactis* qui est nettement plus élevée, et qui se maintient bien plus longtemps au cours du temps lors de la conservation du lait fermenté.

REVENDICATIONS

1. Inoculum qui est spécialement adapté à l'ensemencement direct d'au moins
5 une souche de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* dans un substrat laitier, pour la transformation de ce substrat laitier en produit laitier fermenté adapté à la consommation humaine, caractérisé en ce que cet inoculum comprend, en mélange ou sous forme de collection :
- 10 - de la cystéine qui est non liée à d'autres acides aminés par liaison peptidique,
et
- au moins une souche de *B. animalis lactis*,
- 15 ladite cystéine et ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* se trouvant chacune contenues dans, ou sous la forme de granule(s) congelé(s) et/ou de lyophilisat(s),
- ladite cystéine étant en outre de la L-cystéine base, dont la formule sous forme
20 réduite est $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$, de sorte que le pH de la solution obtenue après :
- décongélation dudit(desdits) granule(s), et/ou
- re-solubilisation dudit(desdits) lyophilisat(s) dans une proportion allant de 1 à 2 gramme(s) de lyophilisat(s) pour 8 à 10 mL d' H_2O ,
- 25 est au moins égal à 4,
- ladite cystéine étant présente dans ledit inoculum en une quantité allant :
- de 1 gramme pour 1.10^{14} ufc de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*),
30 - à 1 gramme pour $3,5.10^{10}$ ufc de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*).
2. Inoculum selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite cystéine est une L-cystéine qui présente un pH supérieur à 4 lorsqu'elle est en solution.

3. Inoculum selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que ladite cystéine n'est pas du chlorhydrate de cystéine, ou du chlorhydrate monohydraté de cystéine.

5

4. Inoculum selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il ne comprend pas de chlorhydrate de cystéine.

10 5. Inoculum selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend au moins un granulé congelé et/ou un lyophilisat, qui contient à la fois :

- tout ou partie de ladite cystéine, et
- des cellules de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis*.

15 6. Inoculum selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'il comprend :

- au moins deux granules congelés, ou
- au moins deux lyophilisats distincts, ou
- au moins un granulé congelé et au moins un lyophilisat,

20 et caractérisé en ce que, pour chacune de ces paires d'entités physiques :

- l'une des deux entités physiques contient tout ou partie de ladite cystéine, sans contenir de cellules de *B. animalis lactis*, et
- l'autre des deux entités physiques contient des cellules de *B. animalis lactis*, sans contenir de ladite cystéine.

25

7. Inoculum selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite cystéine est présente dans ledit inoculum en une quantité allant :

- de 0,01 milligramme par milliard de *ufc* de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*),
- 30 - à 30 milligrammes par milliard de *ufc* de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*).

8. Inoculum selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite cystéine est présente dans ledit inoculum en une quantité allant :

- de 1 gramme pour $0,2 \cdot 10^{14}$ ufc de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*).
- à 1 gramme pour $10 \cdot 10^{10}$ ufc de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*).

5

9. Inoculum selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite cystéine est présente dans ledit inoculum en une quantité allant :

- de 0,05 milligramme par milliard de ufc de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*),
- 10 - à 10 milligrammes par milliard de ufc de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis* (ou, s'il y en a plusieurs, desdites souches de *B. animalis lactis*).

10. Inoculum selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite cystéine est présente dans ledit inoculum en une quantité
- 15 allant de 4,90 mg à 144 mg pour $5 \cdot 10^9$ à $5 \cdot 10^{11}$ ufc de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis*.

11. Inoculum selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que 1 gramme desdits granules à 16-17% de matière sèche comprend de
- 20 $5 \cdot 10^9$ à $5 \cdot 10^{11}$ ufc de ladite au moins une souche de *B. animalis lactis*.

12. Inoculum selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que 1 gramme desdits granules à 16-17% de matière sèche comprend de 4,90 mg à 144 mg de ladite cystéine.

25

13. Inoculum selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il ne comprend pas plus de 0,5% (p/p) de levure, d'extrait de levure ou d'autolysat de levure.

- 30 14. Inoculum selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite souche de *B. animalis lactis* est la souche I-2494.

15. Inoculum selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il comprend en outre au moins une souche de bactérie lactique autre que *B. animalis lactis*.
- 5 16. Inoculum selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que ladite au moins une autre souche de bactérie lactique est présente dans une structure physique distincte de celle qui contient les cellules de *B. animalis lactis*.
- 10 17. Inoculum selon la revendication 14 ou 15, caractérisé en ce que ladite au moins une autre souche de bactérie lactique comprend au moins une souche de *S. thermophilus* et au moins une souche de *L. bulgaricus*.
- 15 18. Granule congelé, susceptible d'être issu d'un inoculum selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une souche de *B. animalis lactis* et de la L-cystéine qui est non liée à d'autres acides aminés par liaison peptidique, ladite L-cystéine étant une cystéine sous forme telle que le pH de la solution obtenue après décongélation dudit(desdits) granule(s) est au moins égal à 4.
- 20 19. Lyophilisat, susceptible d'être un inoculum selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, ou d'être issu d'un tel inoculum, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une souche de *B. animalis lactis* et de la L-cystéine qui est non liée à d'autres acides aminés par liaison peptidique, ladite L-cystéine étant
- 25 sous une forme telle que le pH de la solution obtenue après re-solubilisation dudit(desdits) lyophilisat(s) dans une proportion allant de 1 à 2 gramme(s) de lyophilisat(s) pour 8 à 10 mL d'H₂O, est au moins égal à 4.
- 30 20. Procédé de stimulation de la croissance et/ou du métabolisme de *B. animalis lactis* sur substrat laitier, qui comprend :
- l'inoculation d'un substrat laitier par au moins un inoculum selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, et/ou par au moins un granule selon la revendication 18, et/ou par au moins un lyophilisat selon la revendication 19, et

- le maintien de ce substrat inoculé dans des conditions de température et d'atmosphère favorables au métabolisme de *B. animalis lactis*.

21. Procédé de production d'un produit laitier fermenté à haute valeur probiotique,

5 qui comprend :

- l'inoculation d'un substrat laitier par au moins un inoculum selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, et/ou par au moins un granule selon la revendication 18, et/ou par au moins un lyophilisat selon la revendication 19, et
- 10 - la fermentation de ce substrat par ledit au moins un inoculum.

22. Procédé selon la revendication 21, qui comprend :

- l'inoculation d'un substrat laitier par au moins un inoculum selon l'une quelconque des revendications 1 à 17, et/ou par au moins un granule selon la revendication 18, et/ou par au moins un lyophilisat selon la revendication 19, et
- 15 - l'inoculation de ce substrat laitier par au moins une souche de *S. thermophilus* et au moins une souche de *L. bulgaricus*, et
- la fermentation de ce substrat par ledit au moins un inoculum et lesdites
- 20 souches de *S. thermophilus* et *L. bulgaricus*.

23. Procédé selon l'une quelconque des revendications 20 à 22, caractérisé en ce que ledit inoculum est ajouté dans le substrat laitier dans une quantité qui apporte L-cystéine et cellules de *B. animalis lactis* dans une quantité allant de 7 à 11 mg

25 de L-cystéine par litre de substrat laitier, pour 10^9 à 10^{11} ufc de cellules de *B. animalis lactis* par litre de substrat laitier.

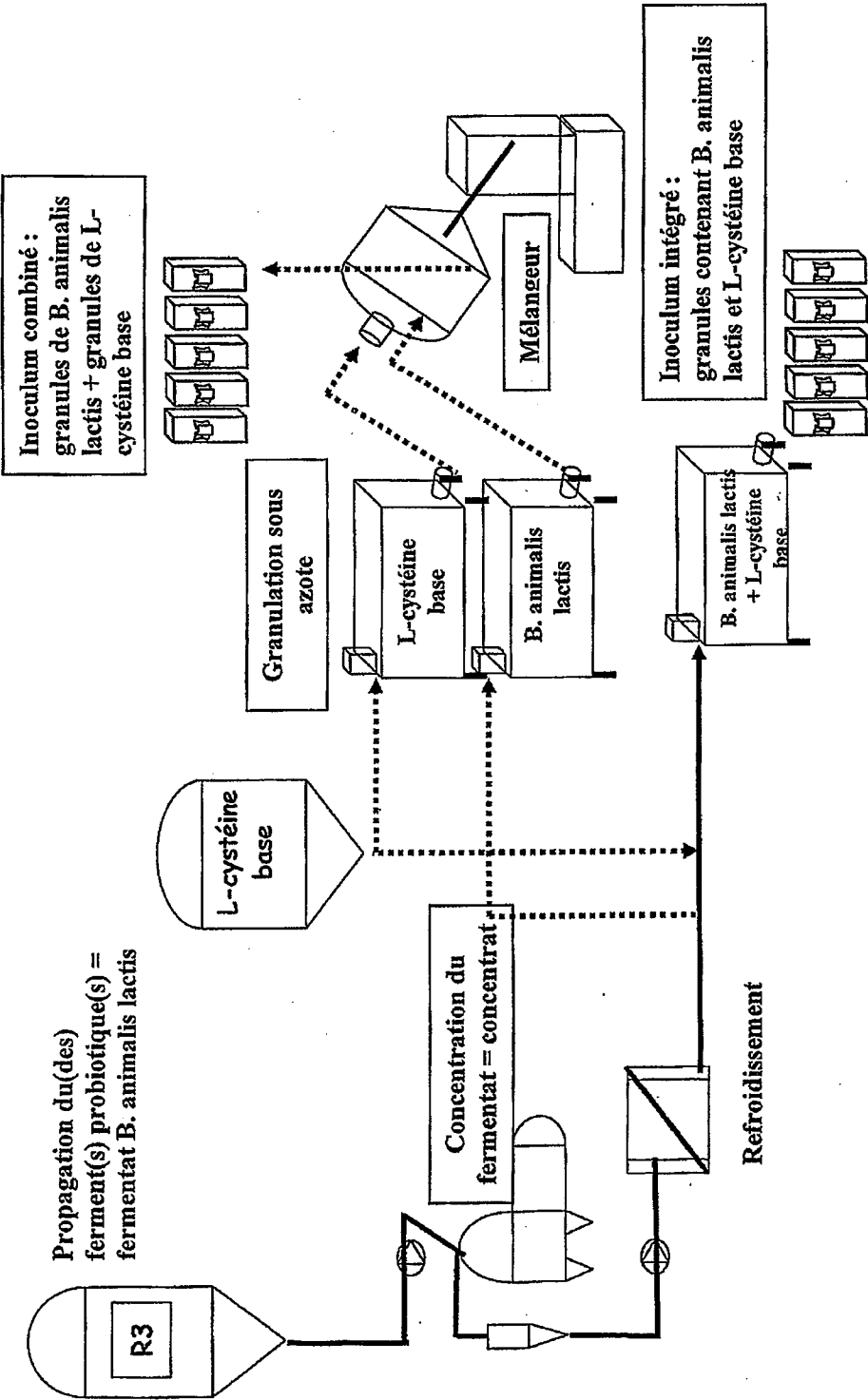
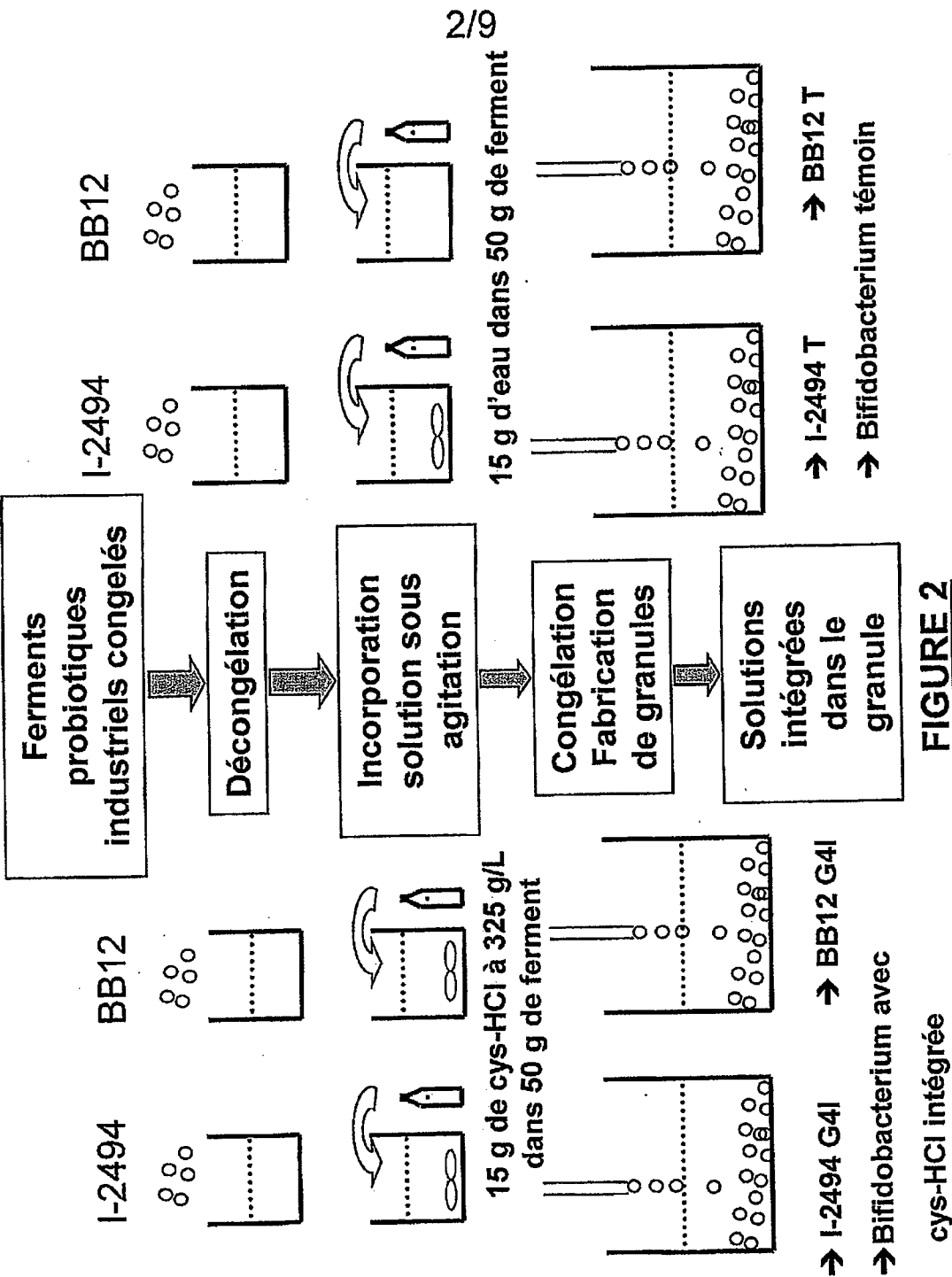


FIGURE 1



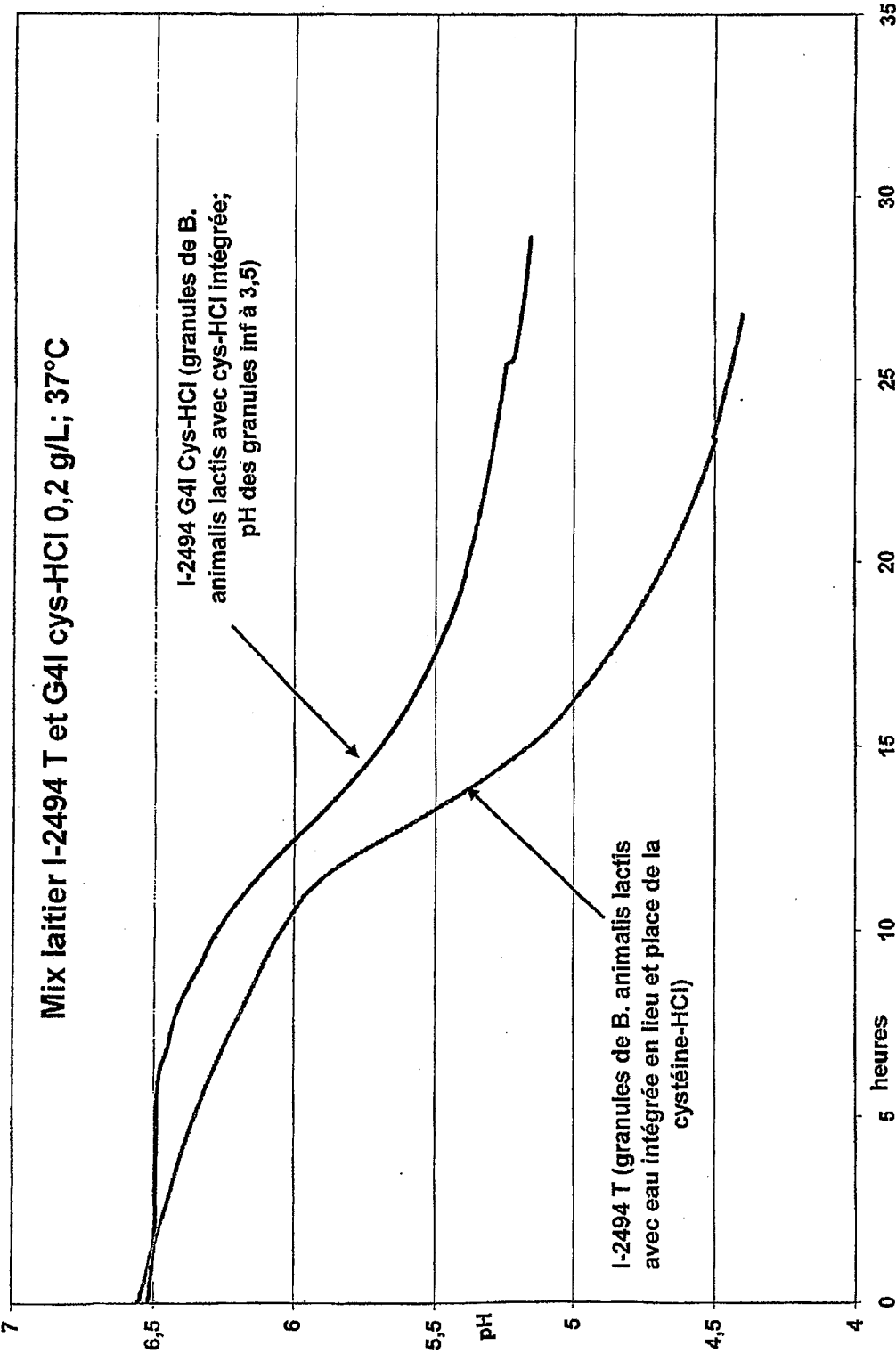
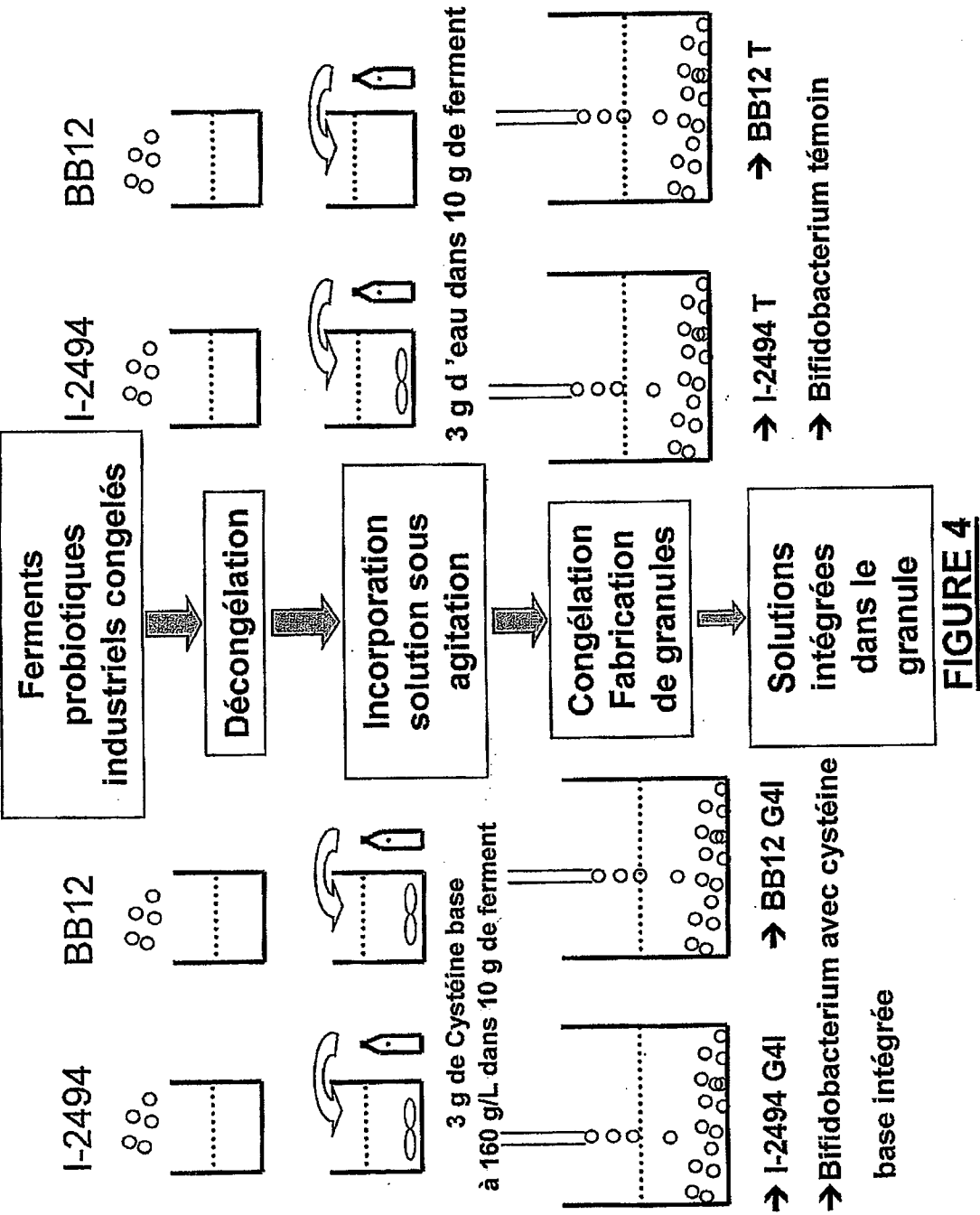


FIGURE 3



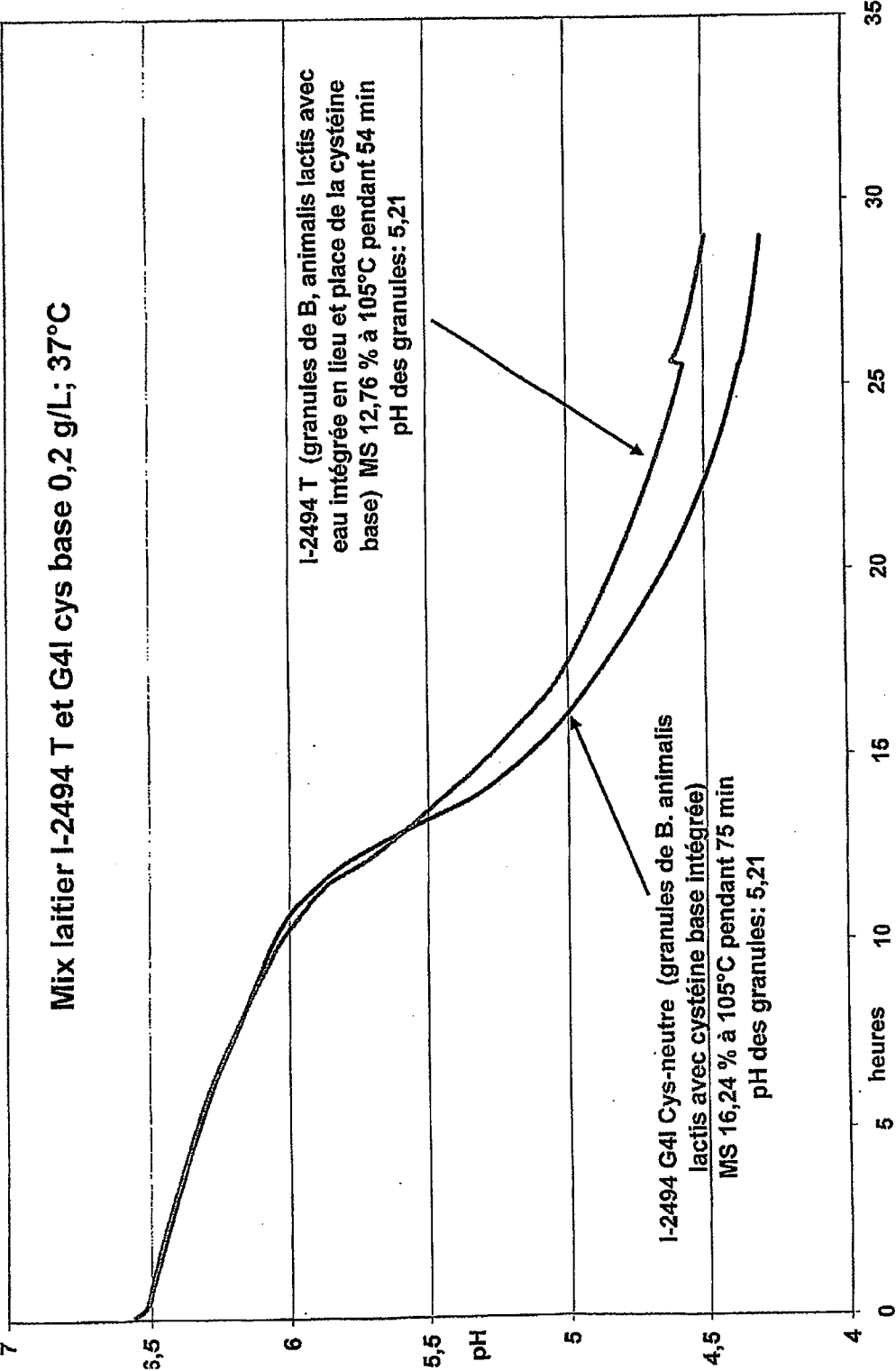


FIGURE 5

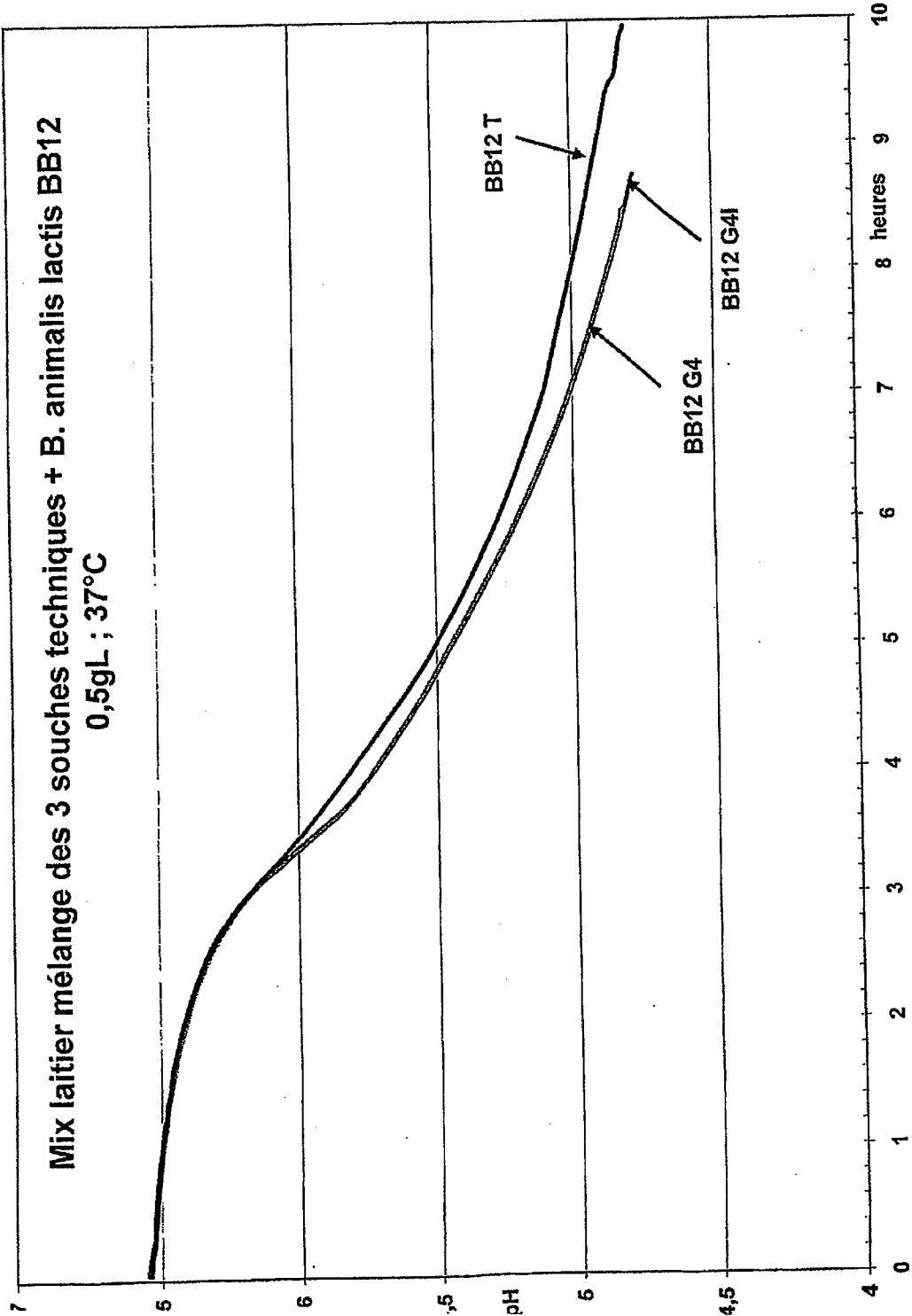


FIGURE 6

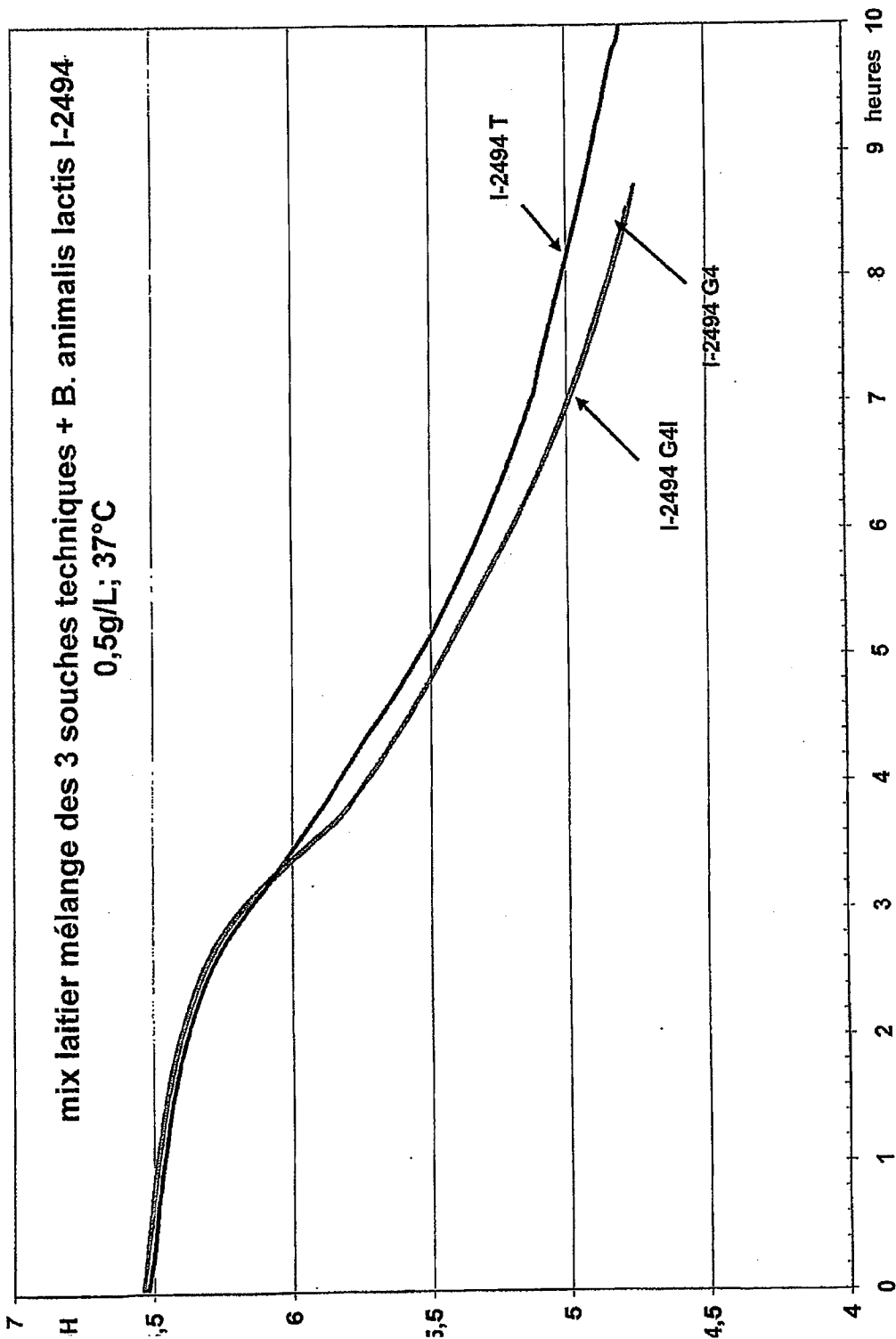


FIGURE 7

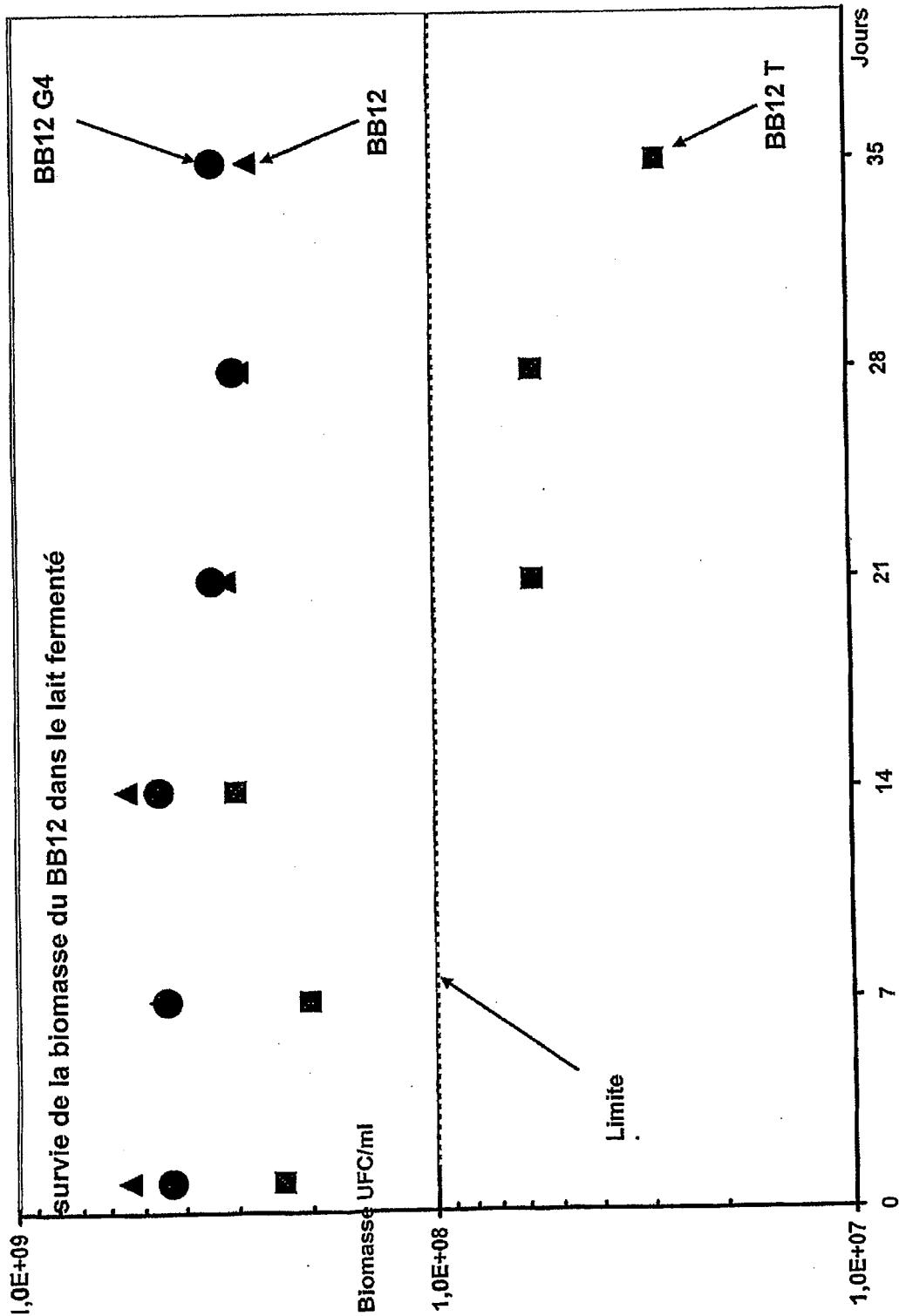


FIGURE 8

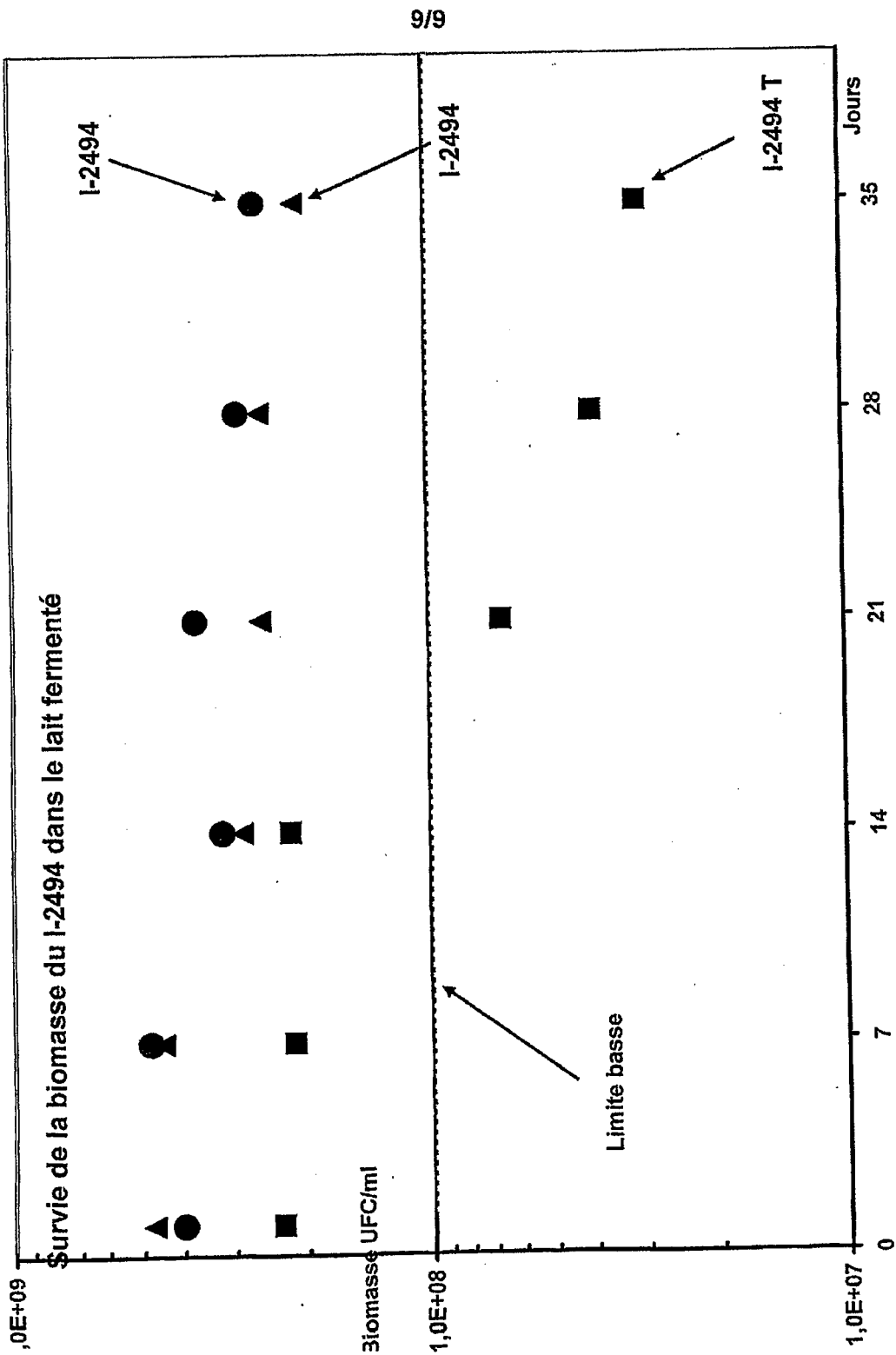


FIGURE 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2007/000916

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A23C9/13 A23C9/123

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 855 182 A1 (GERVAIS DANONE SA [FR]) 26 November 2004 (2004-11-26) page 11, line 21 - line 22; claims; examples	1-23
A	EP 0 486 738 A1 (YAKULT HONSHA KK [JP]) 27 May 1992 (1992-05-27) page 4, line 48 - page 5, line 8; claims; examples	1-23
A	GB 1 271 674 A (NISSHIN FLOUR MILLING CO [JP]) 26 April 1972 (1972-04-26) example 4	1-23
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 September 2007

Date of mailing of the international search report

26/09/2007

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (431-70) 346-2040 Telex 651 000 000

Authorized officer

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2007/000916

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DAVE R I ET AL: "INGREDIENT SUPPLEMENTATION EFFECTS ON VIABILITY OF PROBIOTIC BACTERIA IN YOGHURT" JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, AMERICAN DAIRY SCIENCE ASSOCIATION, SAVOY, IL, US, vol. 81, no. 11, November 1998 (1998-11), pages 2804-2816, XP000787922 ISSN: 0022-0302 figure 1; table 4	1-23
A	DECHTER T H ET AL: "SURVIVABILITY AND BETA-GALACTOSIDASE ACTIVITY OF BIFIDOBACTERIA STORED AT LOW TEMPERATURES" FOOD BIOTECHNOLOGY, DEKKER, NEW YORK, NY, US, vol. 12, no. 1/2, 1998, pages 73-89, XP008039285 ISSN: 0890-5436 the whole document	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2007/000916

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2855182	A1	26-11-2004	AT 347811 T	15-01-2007
			BR PI0410444 A	06-06-2006
			DK 1624761 T3	10-04-2007
			EP 1624761 A1	15-02-2006
			ES 2278329 T3	01-08-2007
			WO 2004103082 A1	02-12-2004
			MX PA05012399 A	06-07-2006
EP 0486738	A1	27-05-1992	AU 6695090 A	18-06-1992
			CA 2030630 A1	23-05-1992
			JP 2308754 A	21-12-1990
			US 5230912 A	27-07-1993
GB 1271674	A	26-04-1972	DE 1934652 A1	22-01-1970
			FR 2014544 A5	17-04-1970

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2007/000916

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. A23C9/13 A23C9/123

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
A23C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 855 182 A1 (GERVAIS DANONE SA [FR]) 26 novembre 2004 (2004-11-26) page 11, ligne 21 - ligne 22; revendications; exemples	1-23
A	EP 0 486 738 A1 (YAKULT HONSHA KK [JP]) 27 mai 1992 (1992-05-27) page 4, ligne 48 - page 5, ligne 8; revendications; exemples	1-23
A	GB 1 271 674 A (NISSHIN FLOUR MILLING CO [JP]) 26 avril 1972 (1972-04-26) exemple 4	1-23
	----- -/-	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 septembre 2007

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26/09/2007

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Fonctionnaire autorisé

Smets, Dieter

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale n°

PCT/FR2007/000916

C(sulte). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DAVE R I ET AL: "INGREDIENT SUPPLEMENTATION EFFECTS ON VIABILITY OF PROBIOTIC BACTERIA IN YOGHURT" JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, AMERICAN DAIRY SCIENCE ASSOCIATION, SAVOY, IL, US, vol. 81, no. 11, novembre 1998 (1998-11), pages 2804-2816, XP000787922 ISSN: 0022-0302 figure 1; tableau 4	1-23
A	DECHTER T H ET AL: "SURVIVABILITY AND BETA-GALACTOSIDASE ACTIVITY OF BIFIDOBACTERIA STORED AT LOW TEMPERATURES" FOOD BIOTECHNOLOGY, DEKKER, NEW YORK, NY, US, vol. 12, no. 1/2, 1998, pages 73-89, XP008039285 ISSN: 0890-5436 le document en entier	1-23

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°
PCT/FR2007/000916

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2855182	A1	26-11-2004	AT 347811 T	15-01-2007
			BR PI0410444 A	06-06-2006
			DK 1624761 T3	10-04-2007
			EP 1624761 A1	15-02-2006
			ES 2278329 T3	01-08-2007
			WO 2004103082 A1	02-12-2004
			MX PA05012399 A	06-07-2006
EP 0486738	A1	27-05-1992	AU 6695090 A	18-06-1992
			CA 2030630 A1	23-05-1992
			JP 2308754 A	21-12-1990
			US 5230912 A	27-07-1993
GB 1271674	A	26-04-1972	DE 1934652 A1	22-01-1970
			FR 2014544 A5	17-04-1970

(19) Organización mundial de la propiedad intelectual
Oficina Internacional

(LOGOTIPO)

(CÓDIGO DE BARRAS)

(43) Fecha de publicación internacional:
17 de Enero de 2008 (17.01.2008)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional:
WO 2008/006949 A1

(51) Clasificación de Patente Internacional:
A23C 9/13 (2006.01) A23C 9/123 (2006.01)

(21) Número de solicitud internacional:
PCT/FR2007/000916

(22) Fecha de presentación internacional:
1 de junio de 2007 (01.06.2007)

(25) Idioma de Presentación: Francés

(26) Idioma de Publicación: Francés

(30) Fecha de Prioridad:
0606421 13 de julio de 2006 (13.07.2006) FR

(71) Solicitante : (para todos los países designados excepto US): **COMPAGNIE GERVAIS DANONE** [FR/FR]; 17, boulevard Asuman, F-75009 Paris (FR).

(72) Inventores; y

(75) Inventores/Solicitantes; (únicamente para US): **MARCHAL, Laurent** [FR/FR]; 8, place de la Cholettiere, F-91360 Villemoisson sur Orge (FR).
DHOOSCHE, Xavier [FR/FR]; 35, rue Boucicaut, F-92260 Fontenay aux Roses (FR).

(74) Agente: **PARIS, Fabienne etc.** : Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 3 rue Auber, F-75009 Paris (FR).

(81) Estados designados (a menos que se indique lo contrario, para cada tipo de protección nacional 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) Estados designados (a menos que se indique lo contrario, para cada tipo de protección regional disponible); Patente (ARIPO) BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW) Patente Eurasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) Patente Europea (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) Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— con reporte de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaciones, consulte "Notas Guía sobre Códigos y Abreviaciones" que aparecen al principio de cada emisión regular de la Gaceta del PCT.

(54) Título: GRANULOS DE CISTEINA Y SUS USOS COMO ACTIVADORES DE CRECIMIENTO DE BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS LACTIS

(57) Resumen: La presente solicitud se refiere a un inóculo que es particularmente apropiado para la inoculación directa de al menos una cepa de *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* en un sustrato lácteo, para la conversión del sustrato lácteo en un producto lácteo fermentado. Este inóculo comprende, en forma de mezcla o colección, la L-cisteína base y al menos una cepa de *B. animalis lactis*. La cisteína y la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* son, cada una contenida en, o en forma de gránulos congelados o liofilizados. Ventajosamente, la cisteína es incorporada dentro de los mismos gránulos o el mismo liofilizado como las células de *B. animalis lactis*.

102/241

GRANULOS DE CISTEINA Y SUS USOS COMO ACTIVADORES DE CRECIMIENTO DE BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS LACTIS

Descripción de la Invención

5 La presente invención es relativa a los gránulos de cisteína y a sus usos como activadores de crecimiento de *Bifidobacterium animalis ssp. lactis*.

Antecedentes de la Invención

10 En el campo de los productos lácteos, el mercado de probióticos está en constante aumentación.

 Con el fin de tener productos que contienen niveles elevados de cepas probióticas aportando cualidades organolépticas interesantes, las industrias lácteas se confrontan con problemas de fermentación mixtas que utilizan, a la
15 vez, fermentos dichos técnicas o tecnologías y fermentos probióticos.

 En efecto, las sepas dichas probióticas son representadas por especies de crecimiento lentas en el sustrato lácteo (tiempos de generación de 1h a 2h por *Bifidobacterium*) después de que los
20 fermentos tecnológicos provienen de fermentos de yogurt de crecimiento mas rápido (tiempos de generación de 15 min. a 30 min. para *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*).

 El buen compromiso entre el crecimiento de fermentos tecnológicos y probióticos es difícil de encontrar, y la mayor parte
25 de las industrias favorecen el aspecto organoléptico con relación

a la cantidad de probióticos: Las poblaciones de probióticos generalmente observadas se colocan entre 10^6 a 10^7 ufc/g de producto fermentado.

5 Actualmente, la mayoría de los estudios elaborados con los probióticos son elaborados con productos que contienen al menos 10^8 ufc/g de cepas probióticas.

10 La búsqueda de un compuesto activador de crecimiento es basada en el conocimiento profundizado de la cepa al nivel de necesidades nutritivas y a la capacidad de sustrato lácteo para encontrarse. Por otra parte hay que verificar que estos compuestos no ejerzan efecto negativo y que no estimulen el crecimiento de las cepas dichas técnicas sean de calidad alimenticia y que no degraden la organoléptica del producto.

15 Entre otras, las cantidades de compuestos activadores que se deben de utilizar para obtener una estimulación y que reemplazan las restricciones anteriores son generalmente muy débiles en proporción con relación a los sustratos lácteos. Estas dosis (generalmente inferiores a 100ml/l) y las diferencias aceptadas no son compatibles con los sistemas de medición y de
20 incorporación utilizadas para realizar los sustratos lácteos, la puesta en obra industrial de las sustancias ahora es más problemática.

El problema es aún mas delicado cuando las cepas de las técnicas puestas en obra deben de funcionar en el cuadro de una
25 simbiosis de múltiples cepas de bacterias lácticas, como es el

caso de las leches fermentadas que utilizan una fermentación simbiótica *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* además de la fermentación láctica destinada a los probióticos.

5 Diferentes pruebas han sido llevadas a cabo en la técnica anterior con el fin de determinar las condiciones que permiten favorecer el crecimiento de probióticos. La mayoría de estos ensayos son, sin embargo, destinados a los cultivos puros de bacterias probióticas sin tomar en cuenta la eventual presencia y actividad de otras cepas lácticas después de la fabricación del
10 producto en medio industrial.

Una solución es descrita en la solicitud francesa 05 07529 presentada el 15 de julio de 2005 a nombre de Compagnie Gervais Danone: ella propone utilizar un ácido aminado azufrado como activador de bifido bacterias.

15 La presente solicitud propone una perfección que es especialmente adaptada a las cepas de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*. La presente solicitud propone también un inóculo que no presenta inconvenientes de la técnica anterior, y que resuelve el problema de activación y/o estimulación simple, segura y eficaz
20 de *B. animalis lactis*, puesto que la producción en medio industrial de un producto lácteo fermentado con valor probiótico que es destinado al consumo humano, y más particularmente a un producto lácteo fermentado que además de la fermentación operada por el probiótico *B. animalis lactis*, utiliza la
25 fermentación simbiótica *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*

Breve Descripción de la Invención

La presente invención es relativa a un inóculo perfeccionado de *Bifidobacterium animalis ssp. lactis*, los usos de este inóculo y los productos lácteos fermentados obtenidos con la ayuda de este inóculo.

El inóculo de la invención es especialmente adaptado a la inoculación directa de al menos una cepa de *B. animalis lactis* en un sustrato lácteo para la transformación del sustrato lácteo en producto lácteo fermentado adaptados al consumo humano y más particularmente en el producto lácteo fermentado con valor probiótico que contiene al menos una cepa de *B. animalis lactis*.

El inóculo comprende en mezcla o en forma de colección, gránulos congelados y/o un (varios) liofilizado(s) en los cuales se encuentra una L-cisteína particular y al menos una cepa de *B. animalis lactis*.

Los inventores han seleccionado una forma particular de cisteína, es decir una L-cisteína en forma tal que los gránulos y/o liofilizados de productos a partir de esta cisteína tienen (una vez descongelados y/o re-solubilizados) un pH que es al menos igual a 4. Un ejemplo de una L-cisteína apropiada y la L-cisteína comúnmente nombrada como cisteína base (en la formula en forma reducida es $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$).

Esta forma particular de cisteína es mas eficaz que las otras formas de cisteínas utilizadas (generalmente de la cisteína- CCl , en forma de clorhidrato monohidratado).

A pesar de la escasa solubilidad de la L-cisteína particular seleccionada por los inventores, los inventores han podido producir un inóculo en formula de gránulos congelados y/o liofilizados que combinan o que integran células de *B. animalis lactis* y esta forma particular de L-cisteína sin perjudicar el estado fisiológico y/o el metabolismo de *B. animalis lactis*.

En una versión dicha "integrada" de inóculo, de acuerdo con la invención al menos un granulo ó liofilizado del inóculo contiene a la vez células de *B. animalis lactis* y esta forma particular de L-cisteína. En una versión dicha "combinada" del inóculo de acuerdo con la invención, una parte de los gránulos o un liofilizado contiene L-cisteína particular de acuerdo con la invención y otra parte de gránulos u otro liofilizado contiene células de *B. animalis lactis*.

La presente invención propone un inóculo de *B. animalis lactis* como activador de cisteína combinado o integrado.

De manera remarcable el inóculo de acuerdo con la invención permite obtener una población de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* (en donde, si hay mas, de estas cepas de *B. animalis lactis*) que no desciende más de $5 \cdot 10^7$ UFC, de preferencia no menos de 10^8 UFC, por gramo de producto fermentado después de al menos 20 días, de preferencia al menos 30 días de conservación de producto fermentado a una temperatura comprendida entre 4 y 11°C (figuras 8 y 9).

El inóculo de acuerdo con la invención es especialmente

adaptado a la producción láctea fermentada con alto valor probiótico, en la medida que permite mantener un muy fuerte contenido de *B. animalis lactis* durante la conservación del producto en medio refrigerado y en la medida donde el activador de L-cisteína particular utilizado es presente en dosis que ni la simbiosis de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, ni las cualidades organolépticas lácteas fermentada se encuentran negativamente afectadas.

Breve Descripción de las Figuras

En la presente solicitud de patente se hace referencia a las siguientes figuras:

Figura 1; esquema de principio de:

- la solución combinada que propone producir gránulos fermentados probióticos y gránulos de cisteína, estos dos tipos de gránulos pueden ser en seguida mezclados juntos, y

- la solución integrada, que propone producir gránulos que contienen a la vez fermentos probióticos y cisteína.

Figura 2: esquema de principio de la producción de gránulos integrados (cisteína HCl+fermentos probióticos): fermento *Bifidobacterium animalis lactis* cepa I-2494 a cepa BB12®, formulado en gránulos integrados que contienen a la vez fermento prebiótico y cisteína, la cisteína siendo cisteína HCl.

Figura 3: evolución del pH a través del tiempo para una mezcla láctea inoculada con:

- gránulos de *Bifidobacterium animalis lactis* cepa I-2494

(curva de muestra, situada debajo), o con

- gránulos integrados que contienen a la vez *Bifidobacterium animalis lactis* cepa I-2494 y cisteína HCl (curva en alto),

5 Ilustrando la degradación del estado fisiológico que es pasado por el probiótico *Bifido bacterium animalis lactis*, puesto que es formulado con la cisteína HCl dentro de los mismos gránulos (formulación integrada con cisteína HCl).

10 **Figura 4:** esquema de principio de la producción de gránulos integrados (cisteína base + fermentos probióticos): fermento *Bifidobacterium animalis lactis* cepa I-2494 a la cepa BB12® formulado en gránulos integrados que contienen a la vez el fermento probiótico y la cisteína, la cisteína siendo cisteína base.

15 **Figura 5:** evolución del pH en el tiempo por una mezcla láctea inoculada con:

- gránulos de *Bifidobacterium animalis lactis* cepa I-2494 (curva de muestra, situado en alto) o con

- gránulos integrados que contiene a la vez *Bifidobacterium animalis lactis* cepa I-2494 y la cisteína base (curva abajo),

20 Ilustrando el hecho de que la selección de cisteína base para la formulación de gránulos integrados de (*Bifidobacterium animales lactis* + cisteína) permite no deteriorar el estado fisiológico del probiótico.

25 **Figura 6 a 9:** comparación de mezclas lácteas,

- que son inoculadas de 0.5 g/L prr gránulos congelados de fermentación técnicos (mezcla de gránulos de *S. thermophilus* I-1630, *L. bulgaricus* -I-1632 y *L. bulgaricus* I-1519), y gránulos congelados de fermento probiótico *Bifidobacterium animalis lactis* (cepa BB12® ó cepa I-2494)

- en las cuales se aporta cisteína base en forma de gránulos de cisteína distintos a los gránulos de fermento probiótico (solución combinada G4) o también en forma integrada de gránulos de fermento probiótico (solución integrada G4I) en comparación con las mezclas de muestra en las cuales el agua es aportada en lugar de la cisteína integrada;

Figuras 6 y 7: evolución de pH en el tiempo (en horas);

Figuras 8 y 9: evolución de la biomasa (UFC/ml) en el tiempo (en días) después de la conservación del producto lácteo fermentado a 10°C;

Figuras 6 y 8: fermento probiótico *Bifidobacterium animalis lactis* cepa BB12®.

- mezclas lácteas BB12® T=mezcla láctea inoculada con 0.5g/L en una mezcla de gránulos de fermentos técnicos y gránulos de muestra del fermento del BB12® (gránulos que contienen agua en lugar de la cisteína),

- mezcla láctea BB12 ® G4= mezcla láctea inoculada como la mezcla lácteo BB12 ® T, con 0.5g/L en una mezcla de gránulos de fermentos técnicos y gránulos de muestra de fermento *Bifidobacterium* BB12®, pero en la cual se agrega cisteína base

en forma de gránulos congelados distintos a los gránulos de probiótico, de manera que se obtiene una concentración de 7.5mg/L de cisteína en la mezcla,

- mezcla láctea BB12® G4I= mezcla láctea inoculada con 0.5g/L en una mezcla de gránulos de fermentos técnicos y de gránulos integrados *Bifidobacterium* BB12®, estos gránulos integrados de probióticos contienen cisteína base, de manera que se obtienen 7.5mg/L de cisteína base en la mezcla;

Figura 7 y 9: fermento probiótico *Bifidobacterium animalis* *lactis* I-2494

- mezcla láctea I-2494 T=mezcla láctea inoculada con 0.5g/L en una mezcla de gránulos de fermentos técnicos y de gránulos de muestra del fermento I-2494 (gránulos que contienen agua en lugar de la cisteína)

- mezcla láctea I-2494 G4=mezcla láctea inoculada cultivada en la mezcla láctea I-2494 T, es decir con 0.5g/L de una mezcla de gránulos de fermentos técnicos y de gránulos de muestra de fermento *Bifidobacterium* I-2494, pero en la cual se agrega cisteína base en forma de gránulos congelados distintos a los granos de probiótico de manera que se obtiene una concentración de 0.75mg/L de cisteína en la mezcla,

- mezcla láctea I-2419 G4I= mezcla láctea inoculada con 0.5g/L en una mezcla de gránulos de fermentos técnicos y de gránulos integrados de fermento *Bifidobacterium* I-2494, estos gránulos integrados de probiótico contienen cisteína base de

manera que se obtiene 7.5mg/L de cisteína base en la mezcla.

Descripción Detallada de la Invención

Algunas definiciones:

En la presente solicitud, a todos los términos se le confiere la importancia y la significación que tienen usualmente en el dominio de la industria láctea y/o la industria alimenticia.

Por lo consiguiente, puesto que se hace referencia a una "fermentación láctica" se trata de una fermentación láctica acida que se traduce por una acidificación seguida por la producción de ácido láctico que puede acompañarse de la producción de otros ácidos, de dióxido de carbono y varias sustancias tales como exopolisacáridos (EPS) o sustancias aromáticas por ejemplo diacetilo y acetaldehído.

Asimismo, se entiende por "fermento láctico", un microorganismo o una cepa de microorganismo que vive o es viable, que es capaz de llevar a cabo una fermentación láctica acidificante en el sustrato lácteo.

Al término "leche fermentada" se le confiere la significación usual del dominio de la industria láctea, es decir, los productos que son destinados al consumo animal más particularmente humano y que se elaboran de la fermentación láctica acidificante de un sustrato lácteo. Estos productos pueden contener ingredientes secundarios tales como frutas, vegetales, azúcares, aromas, etc.

El nombramiento de "leche fermentada" responde a las

normas oficiales estrictas. También se puede referir a los Codex Alimentarius (preparado por la Commission du Codex Alimentarius, bajo el ejido de la FAO e l'OMS y publicada por la División de Información de la FAO, disponible en línea en <http://codexalimentarius.net> ; más particularmente el volumen 12 del Codex Alimentarius "Normes Codes pour le lait et les produits laitiers" y la norma "CODEX STAN A-11(a)-1975", en donde el contenido es incorporado en la presente solicitud por referencia).

Se puede más particularmente referirse a Décret français n°88-1203 del 30 de diciembre de 1988 con relación a las leches fermentadas y al yogurt o yogur publicado en el Journal Officiel de la République Française del 31 de diciembre de 1988. El contenido del Decreto es incorporado en la presente solicitud por referencia.

El término "leche fermentada" es también reservado en la presente solicitud al producto lácteo con un sustrato lácteo que ha pasado por un tratamiento al menos equivalente a la pasteurización, cultivado con microorganismo que pertenece a la especie o especies características de cada producto. La coagulación de "leches fermentadas" no debe obtenerse por otros medios que los que resultan de los microorganismos utilizados.

Una "leche fermentada" que no pasó por ningún tratamiento permite extraer un elemento constitutivo del sustrato lácteo utilizado y que notablemente no paso por un escurrimiento de coagulo.

Una "leche fermentada" puede ser adicionada con uno o más extractos de aromas, una o más aromas naturales así como en el límite de 30 por 100 por peso de producto final, de uno o más azúcares y otros productos alimenticios que le dan un sabor específico, así como los cereales.

La incorporación de productos de sustitución de materias grasas y/o proteicas de origen no lácteo es suspendida.

La cantidad de ácido láctico libre contenida en una leche fermentada no debe de ser inferior a 0.6 gramos por 100 gramos durante de la venta al consumidor y el contenido en materia proteica con relación a la parte láctea no debe ser inferior al de una leche normal.

El término "sustrato lácteo" es, en la presente solicitud entendido como significado "leche" en sentido donde se escucha industria láctea, es decir, un sustrato que contiene esencialmente leche y/o compuestos lácteos, y en donde la composición es tal que la fermentación láctica del sustrato lácteo por cepas de bacteria(s) láctica(s) tales como *S. thermophilus* y/o *L. bulgaricus* lleva a un producto que puede ser destinado a la alimentación humana y más particularmente que responde al nombre de leche fermentada.

El término "sustrato lácteo", cubre también la leche de origen animal en todas sus formas y en todas sus variantes de composiciones: leche descremada o no, leche concentrada o no, leche ultrafiltrada o no, leche fresca o no, leche en polvo o no,

leche reconstituida o no, leche recombinada o no, leche enriquecida con constitutos lácteos o no, leche adicionada o no con agentes útiles a la elaboración o a la calidad de producto final tales como agentes de sabor, aroma, azúcares, etc. Por ejemplo un sustrato lácteo destinado a la fabricación de leches fermentadas puede comprender leche descremada, crema y polvo lácteo descremado (ejemplo 1 a continuación).

El término "sustrato lácteo" no incluye solamente en su importancia el significado de "medio de cultivo". En efecto el término "medio de cultivo" se refiere a un medio destinado para favorecer y/o estimular el crecimiento de bacterias lácticas y por eso producir un inóculo de bacterias lácticas, puesto que el término "sustrato lácteo" se refiere a un medio que es destinado a pasar una transformación por fermentación para producir un alimento destinado a un consumo humano. Por lo consiguiente, varios compuestos que pueden agregarse a un medio de cultivo para estimular y/o favorecer el crecimiento láctico no pueden agregarse a un sustrato lácteo para obtener una leche fermentada o yogur.

Es notablemente el caso:

- de varios agentes tenso-activos y/o emulsificadores y/o agentes solubilizantes y/o detergentes tales como polioxietileno-sorbitan-20-monooleato (también conocido bajo el nombre de polisorbato 80, o Tween 80),
- de ácidos de tipo citrato, acetato,

- de extractos de carne,
- peptonas vegetales,
- glicerofosfatos.

Los fermentos lácticos utilizados más seguido comprenden
5 las siguientes bacterias lácticas:

- *Streptococcus thermophilus* (por ejemplo, la cepa I-1630 disponible por la CNCM) y
- *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, o *Lactobacillus bulgaricus* (por ejemplo las cepas I-1519 y I-1362
10 disponibles por la CNCM),
- *Pediococcus acidilacti*,
- *Leuconostoc*, tales como:
 - *Leuconostoc cremoris*,
 - *Leuconostoc dextranicum*,
 - 15 • *Leuconostoc lactis*,
- *Lactobacillus*, tales como:
 - *Lactobacillus acidophilus* (por ejemplo, la cepa I-0967 disponible por la CNCM),
 - *Lactobacillus helveticus*,
 - 20 • *Lactobacillus delbrueckli ssp. lactis* (por ejemplo la cepa I-2843 disponible por la CNCM),
- *Lactococcus*, tales como:
 - *Lactococcus cremoris*,
 - *Lactococcus lactis ssp. lactis* (por ejemplo la
25 cepa I-1631 disponible por la CNCM),

- *Lactococcus lactis ssp, lactis biovar diacetylactis* (por ejemplo la cepa I-2806 disponible por la CNCM),

- *Bifidobacterium*, tales como:

- *Bifidobacterium animalis lactis* (por ejemplo la cepa I-2494 y disponible por la CNCM o la cepa comercializada bajo la referencia BB12® por Chr. Hansen),
- *Bifidobacterium breve*,
- *Bifidobacterium bifidum*,
- *Bifidobacterium longum*,
- *Bifidobacterium infantis*.

Las bacterias lácticas son definidas como siendo bacterias lácticas vivas que cuando son consumidas en cantidades suficientes, tienen efectos benéficos en la salud más allá de su valor nutricional base (definición oficial de la Organización Mundial de la Salud).

Las bacterias lácticas probióticas comprenden notablemente las siguientes bacterias lácticas:

- *Lactobacillus*, tales como:

- *Lactobacillus acidophilus* (por ejemplo, la cepa I-0967 disponible por la CNCM),
- *Lactobacillus casei* (por ejemplo, la cepa I-518 disponible por la CNCM),
- *Lactobacillus helveticus*,

- *Lactobacillus delbrueckii ssp. lactis* (por ejemplo la cepa I-2843 disponible por la CNCM),

- *Bifidobacterium*, tales como:

- *Bifidobacterium animalis lactis* (por ejemplo, la cepa I-2494 disponible por la CNCM, o la cepa comercializada bajo la referencia BB12® por Chr. Hansen,
- *Bifidobacterium breve*,
- *Bifidobacterium bifidum*,
- *Bifidobacterium longum*,
- *Bifidobacterium infantis*.

Las bacterias lácticas probióticas no son simples aditivos alimenticios suficientes para agregarse en masa a los productos lácteos. Se trata de bacterias vivas que llevan a una fermentación acidificante y en donde el metabolismo es afectado por las condiciones bajo las cuales las mismas se encuentran durante la fabricación del producto lácteo fermentado, después, en seguida de su conservación del producto lácteo fermentado hasta la fecha límite del consumo (FLC).

Las fechas límite de consumo dependen de los periodos legales de conservación fijada para la legislación en vigor. Para los productos lácteos fermentados frescos, tales como las leches fermentadas, la FLC es generalmente de 30 días a contar de la fecha de fabricación.

Por fermento, bacteria o cepa técnica, aquí se entiende un

fermento, bacteria o cepa que participa a la estructura y/o a la textura del producto lácteo fermentado en comparación, con el fermento, bacteria o cepa de función esencialmente probiótica.

Por ejemplo, se puede producir una leche fermentada por fermentación simbiótica *L. bulgaricus*-*S. thermophilus* utilizando igualmente al menos una cepa de *B. animalis lactis* con el nombre de cepa probiótica. En el caso de la figura, las cepas dichas técnicas son las cepas de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*.

Enfoque y aspectos de la invención:

La invención es relativa a un inoculo que es especialmente adaptada al cultivo directo de al menos una cepa de *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* en un sustrato lácteo para la transformación de este sustrato lácteo en producto lácteo fermentado que es adaptado al consumo humano y que tiene valor probiótico, así como sus usos de este inoculo en el cuadro de la producción de estos productos lácteos.

El inoculo de acuerdo con la invención es más particularmente adaptado a la producción de producto lácteo fermentado, que es obtenido por fermentación de un sustrato lácteo por el probiótico *B. animalis lactis* y por la simbiosis *S. thermophilus*-*L. bulgaricus*.

Un tal producto contiene al menos una cepa de *S. thermophilus*, al menos una cepa de *L. bulgaricus* y al menos una cepa de *B. animalis lactis* en su forma viva.

El inoculo de acuerdo con la invención comprende al menos

una cepa de *B. animalis lactis*.

El inóculo de acuerdo con la invención contiene una cisteína particular, es decir, la L-cisteína que es en forma de gránulos y/o liofilizados que es obtenido utilizando esta forma de L-cisteína son tales que el pH de la solución se obtiene por:

- descongelación del (de los) gránulo(s), y/o
- re-solubilización del (de los) liofilizado(s), en una proporción de 1 a 2 gramos liofilizados por 8 a 10 ml de H₂O, son al menos igual a 4.

De preferencia el pH no rebasa el pH de 8.

Por este hecho, se elegirá de preferencia una L-cisteína en forma, de manera que presenta un pH que es debajo de 4 puesto que es colocada en la solución. Por ejemplo, una solución que contiene 1.25 gramos de esta forma de cisteína para 50 ml de H₂O presenta un pH que va desde 4.5. a 5.5.

Un ejemplo de una forma similar de cisteína es la L-cisteína comúnmente nombrada L-cisteína base (o L-cisteína en forma base). En forma reducida la L-cisteína base tiene como fórmula $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$.

La L-cisteína base no es la cisteína-HCl: no es ni un clorhidrato de cisteína, ni un clorhidrato monohidratado de cisteína.

La elección de esta cisteína particularmente resulta en una selección hecha entre las diferentes formas de cisteína disponible.

Esta cisteína particular es asimilable por *B. animalis lactis* y es un activador de crecimiento de *B. animalis lactis* en sustrato lácteo.

Esta cisteína particular es adaptada al consumo humano. Ella es conforme a las legislaciones relativas de los productos lácteos fermentados destinados al consumo humano.

Esta cisteína particular permite, entre otros, estimular el crecimiento o al menos el metabolismo de *B. animalis lactis*, sin perturbar el metabolismo de otras bacterias lácticas no probióticas, y notablemente sin perturbar la fermentación láctica simbiótica ejercida por *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*.

En medida de todas sus propiedades, esta cisteína particular permite producir un inóculo dicho integrado que comprende a la vez al menos una cepa de *B. animalis lactis* y la cisteína en una misma unidad física sin el crecimiento o por lo menos el metabolismo de esta cepa de *B. animalis lactis* no es negativamente afectado.

De manera muy preferible, el inóculo de acuerdo con la invención no comprende cisteína en forma ácida tal como la cisteína-HCl (clorhidrato de L-cisteína de la fórmula $\text{HSCN}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}\cdot\text{HCl}$).

El inóculo de acuerdo con la invención se presenta en una forma física particular. El se presenta en forma de gránulo(s) congelado(s) y/o liofilizado(s).

Esta forma particular del inóculo es especialmente adaptada

a la inoculación directa.

La elección de la cisteína particular anteriormente mencionada permite fabricar el inóculo bajo estas particularidades y de obtener un inóculo particularmente activo.

5 La elección de la L. cisteína particular de la invención permite mezclar la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* y la cisteína en conjunto, para producir gránulos congelados y/o liofilizado(s) que comprenden a la vez esta cepa *B. animalis lactis* esta cisteína en los mismos gránulos y/o del mismo liofilizado sin
10 que el crecimiento, o al menos el metabolismo de esta cepa *B. animalis lactis* no sea negativamente relacionada.

De estos resultados no se puede atener utilizando la cisteína en su forma ácida de tal forma que la cisteína-HCl (clorhidrato de L-cisteína de la formula $\text{HSCN}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}\cdot\text{HCl}$),
15 en lugar de la L-cisteína base.

Los inventores proponen también un gránulo congelado o un liofilizado en el cual se encuentra, a la vez, células de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* y la L-cisteína particular. Este gránulo congelado o liofilizado puede ser calificado del
20 inóculo de *B. animalis lactis* con activador integrado. Este gránulo congelado o liofilizado es un modo de elaboración preferido de la invención.

Una alternativa de la vía de integración del activador puede consistir en no relacionar el activador con el mismo gránulo o
25 liofilizado con la cepa de *B. animalis lactis* pero para producir

gránulos congelados y liofilizados distintos.

Se puede, por ejemplo, producir y combinar en conjunto, por ejemplo, en forma de mezcla o colección ("kit-de-partes"):

5 - gránulos congelados que contienen células de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis*, de gránulos congelados distintos que contienen la L-cisteína particular (=gránulos no integrados pero combinados); o

10 - un liofilizado que contiene células de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* y un liofilizado que contiene la L-cisteína particular (=liofilizados no integrados, pero combinados); o

15 - gránulos congelados que contienen células de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis*, y un liofilizado que contiene la L-cisteína particular o al contrario (= combinación de gránulos y liofilizado(s)); o también

- una mezcla de estas alternativas.

Estos inóculos con alternativas directas de gránulos congelados que consisten en combinar en conjunto los medios de la invención pero en formas físicas distintas.

20 Estos inóculos son aquí calificados como "combinados", y entran en el campo de la presente solicitud.

La Figura 1 muestra una ilustración del modo de producción de gránulos integrados de acuerdo con la invención y del modo de producción de gránulos combinados de acuerdo con la invención.

25 La invención resulta de la combinación de una selección de

cisteína particular (preferiblemente L-cisteína base) y del uso de una forma física particular (gránulos congelados y/o liofilizado(s), que especialmente adaptada al cultivo directo.

El inóculo de acuerdo con la invención es, entre otros, especialmente adaptado a la estimulación del crecimiento de cepas de *B. animalis lactis*. El mismo no puede ser adaptado a la estimulación de otras especies o géneros de bacterias probióticas.

Para estimular el crecimiento de cepas de *B. animalis lactis*, se tuvo que colocar un activador de crecimiento que ejerce un efecto positivo en el crecimiento o al menos en el metabolismo de *B. animalis lactis* sin ejercer un efecto negativo o nocivo en la textura, ni en la estructura ni en la calidad sanitaria y gustativa del producto lácteo fermentado obtenido.

Este problema es particularmente delicado, puesto que se trata de producir productos lácteos fermentados que, en cuanto a *B. animalis lactis*, necesitan utilizar otras bacterias lácticas.

Cada una de las bacterias lácticas utilizadas no tienen, en efecto, muy necesariamente todos los metabolismos y condiciones favorables a una especie o un género no son necesariamente favorables a una otra especie o a un otro género.

Asimismo, puede ser delicado encontrar condiciones de fermentación láctica que convienen al ensamble de cepas utilizadas.

Con este elemento se agrega el hecho que la fermentación

láctica debe responder a requisitos de cinética de acidificación muy particular, para prevenir, fabricar un producto lácteo fermentado sano y de calidad.

5 Es deseable obtener un pH de 5.5 lo más rápido posible de manera que se limiten varios riesgos de contaminaciones. Una cinética rápida de acidificación va al encuentro de un buen crecimiento y/o de un buen metabolismo de *B. animalis lactis*.

10 El caso de las leches fermentadas obtenidas por fermentación de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* y, entre otras, por fermentación del probiótico *B. animalis lactis* es particularmente delicado, en la medida que la fermentación de *B. animalis lactis* debe de llevar a una fermentación láctica simbiótica que implica al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus*, y al menos una cepa de *Lactobacillus delbrueckii*
15 *ssp. bulgaricus*.

O, *B. animalis lactis* es una especie de crecimiento lento en sustrato lácteo (tiempos de generación de orden desde 1 a 2 horas), puesto que los fermentos técnicos *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* son de crecimiento rápido (tiempos de generación de
20 orden de 15 a 30 minutos).

En estas circunstancias, es particularmente complejo prevenir dominar el conjunto de los parámetros.

El inóculo de acuerdo con la invención es especialmente conseguido por no ejercer efecto negativo en la fermentación que
25 se podrían llevar por cepas de bacterias lácticas dichas técnicas,

y notablemente en la fermentación simbiótica de *Streptococcus thermophilus* y de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*.

Asimismo el inóculo de acuerdo con la invención es especialmente adaptado al uso en el cuadro de la producción de una leche fermentada que comprende al menos una cepa de *B. animalis lactis* con el nombre de cepa probiótica, y que es obtenida por fermentación de un sustrato lácteo por al menos una cepa de *Streptococcus thermophilus* y al menos una cepa de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* en medida de la fermentación operada por *B. animalis lactis*.

El inóculo de acuerdo con la invención responde a diferentes requisitos y permite obtener un producto lácteo fermentado con alto valor probiótico, que es de calidad excepcional.

Estando así, el hecho que el inóculo de acuerdo con la invención sea optimizado por la situación particularmente compleja poseída por la fermentación simbiótica de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* en presencia de una fermentación de *B. animalis lactis*, no impide evidentemente utilizar en situaciones menos complejas, tales como las de la fermentación de un sustrato lácteo que no utilizan solamente un género especie de bacteria láctica diferente a *B. animalis lactis* en la medida de al menos de una cepa de *B. animalis lactis* que no utilizaría solamente cepas de *B. animalis lactis*.

Una de las ventajas del inóculo de acuerdo con la invención

es que permite obtener una población de la misma de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* (o si hay más de las cepas de *B. animalis lactis*) que es muy superior a lo que sería obtenido en las mismas condiciones pero utilizando un inóculo clásico de la misma cepa de *B. animalis lactis* sin activador de crecimiento, y es igualmente superior a lo que se obtendría en las mismas condiciones pero utilizando un inóculo de la misma cepa de *B. animalis lactis* y de la cisteína-HCl con el nombre de activador de crecimiento.

El inóculo de acuerdo con la invención permite obtener una población de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* (o si hay mas, de las cepas de *B. animalis lactis*) que es de al menos con $5 \cdot 10^7$ ufc por gramo de producto fermentado al final de la fermentación, de preferencia de al menos 10^8 ufc por gramo de producto fermentado al final de la fermentación.

De manera remarcable el inóculo de acuerdo con la invención muestra una ventaja que permite obtener una población de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* (o , si hay mas, de las cepas de *B. animalis lactis*) que no aumenta más de $5 \cdot 10^7$ ufc por gramo de producto fermentado después de al menos 20 días de preferencia de al menos 30 días de conservación del producto fermentado a una temperatura comprendida entre 4 y 11°C, de preferencia a una temperatura comprendida entre 4 y 10°C, más preferiblemente a un temperatura comprendida entre 4 y 9°C.

De manera particularmente remarcable, el inóculo de

acuerdo con la invención presenta la ventaja de permitir obtener una población de la misma de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* (o, si hay más, de las cepas de *B. animalis lactis*) que no baja más de 10^8 ucf por gramo de producto fermentado después de al menos 20 días, de preferencia de al menos 30 días de conservación del producto fermentado a una temperatura comprendida entre 4 y 11°C, de preferencia a una temperatura comprendida entre 4 y 10°C, más preferiblemente a una temperatura comprendida entre 4 y 9°C: ver figuras 8 y 9, que ilustran el mantenimiento hasta los 30 días de conservación a 10°C de la población de *B. animalis lactis* en leches fermentadas (*S. thermophilus*-*L. bulgaricus*+*B. animalis lactis*) producidas con la ayuda de un inóculo de acuerdo con la invención en comparación con las leches fermentadas de muestra en donde la población de *B. animalis lactis* sube rápidamente en el día 21.

Otra ventaja del inóculo de acuerdo con la presente invención es que se presenta en forma que se adapta a un uso en un contexto industrial.

En efecto, el inóculo de acuerdo con la invención es en forma perfeccionada que permite utilizar, de manera particular segura y fácil, el cuadro de una producción industrial de producto lácteo fermentado.

Las dosis de activadores de crecimiento y los intervalos aceptados pueden ser a veces delicados para resumir en relación con los sistemas de medidas y de incorporación utilizados para

realizar los productos lácteos fermentados en medio industrial. Por ejemplo, un exceso de activador, si es benéfico por la cepa probiótica, es generalmente muy nefasto a la calidad del producto lácteo fermentado obtenido: le puede dar un gusto no apreciado (por ejemplo, gusto afectado por la cisteína utilizada en exceso),
5 puede ejercer efectos negativos o nocivos en la fermentación de cepas técnicas (eso es, por ejemplo, el caso para *S. thermophilus*, puesto que un exceso de cisteína es utilizado). El total de cantidades de activador agregado presenta igualmente un
10 interés en el plano sanitario, en la medida en donde ese total limita las intervenciones humanas, y las modificaciones y adaptaciones de circuitos industriales, en donde la calidad sanitaria debe ser absolutamente garantizada. El total de cantidades de activador agregado presenta igualmente un interés
15 económico.

Se puede encontrar que el experto en la técnica tenga un activador de crecimiento adaptado, pero que conoce dificultades de uso en su medio industrial, puesto que el total de la cantidad de activador agregado parece delicado en ese contexto.

20 El inóculo de acuerdo con la invención es, en cuanto a sí mismo, muy fácil de utilizar en un contexto industrial y permite dominar de manera segura y simple las cantidades de activador utilizado. El inóculo de acuerdo con la invención es más fácil de utilizar y permite fabricar, de manera eficaz y segura, en medio
25 industrial, productos lácteos fermentados que presentan

excelentes calidades texturales, estructurales y gustativas y que contienen el probiótico *B. animalis lactis* en dosis particularmente elevadas.

5 El inóculo de la invención es el resultado de un compromiso entre notablemente:

- la exigencia de preservar excelentes cualidades de producto lácteo fermentado por el consumidor (calidades de estructura, de textura, calidades sanitarias, calidades gustativas),
 - el deseo de mejorar más el contenido de *B. animalis lactis*, de manera que acentúe los efectos probióticos del producto, y
 - la voluntad de colocar un inóculo en forma perfeccionada, que es especialmente adaptado a inoculación directa y que permite dominar con toda seguridad y simplicidad
- 15 las cantidades de activadores agregadas.

El inóculo de acuerdo con la invención responde a diversos objetivos.

El inóculo de acuerdo con la invención comprende una mezcla o en forma de colección ("kit-de-partes"):

- 20 - al menos una cepa de *B. animalis lactis*, y
 - L-cisteína en forma libre (es decir L-cisteína que no es enlazada a otros ácidos aminados por el enlace peptídico) esta L-cisteína en forma libre siendo, entre otros, en forma que permita obtener gránulos y/o liofilizados que son tales que el pH de la
- 25 solución obtenida después de:

- descongelación del (de los) gránulo(s), y/o
- re-solubilización del (de los) liofilizado(s) en una proporción de 1 a 2 gramos de liofilizado(s) por 8 a 10ml de H₂O.

5 es al menos igual a 4.

De preferencia este pH no rebasa más del pH 8.

Para este hecho se elegirá de preferencia una L-cisteína libre en forma que presenta un pH que es debajo de 4 puesto que es colocado en la solución. Por ejemplo, una solución que
10 contiene 1.25 gramos de esta forma de cisteína para 50 ml de H₂O presenta un pH que va de 4.5. a 5.5..

Un ejemplo preferido de una tal forma de cisteína es la L-cisteína comúnmente nombrada L-cisteína base (o L-cisteína en forma base). En forma reducida, la L-cisteína base tiene como
15 formula HSCH₂CH(NH₂)CO₂H.

Las cantidades de L-cisteína particulares de acuerdo con la invención y de células de *B. animalis lactis* contenidas en el inóculo de la invención son repartidas en estructuras físicas sólidas a saber en gránulos congelados y/o uno (varios)
20 liofilizado(s).

La cisteína y la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* puede ser contenida en conjunto en la misma estructura sólida, o bien ser presentada en estructuras sólidas distintas. Estas estructuras sólidas distintas, pueden ser condicionadas de
25 maneras separadas pero en conjunto o bien estando en mezcla.

Bien entendido, una mezcla de estructura sólida común, que contiene a la vez L. cisteína particular de acuerdo con la invención y células de *B. animalis lactis* y de estructuras sólidas distintas podrían ser realizadas.

5 La cisteína y la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* pueden ser:

- en conjunto con los mismos gránulos congelados y/o del mismo liofilizado, y/o

- separados, pero en colección ("kit-de-partes") con gránulos congelados distintos y/o liofilizado(s) distintos.

10

Asimismo, y de acuerdo con una modalidad ventajosa de la invención toda o parte de la L-cisteína particular y de *B. animalis lactis* pueden estar juntos en los mismos gránulos congelados o en el mismo liofilizado. El inóculo de la invención comprende al menos un gránulo congelado y/o liofilizado, que contiene a la vez L-cisteína particular de acuerdo con la invención y células de *B. animalis lactis*.

15

De manera preferida, el conjunto de cantidades de L-cisteína particular y de células de *B. animalis lactis* contenidas en el inóculo que están juntos en los mismos gránulos congelados o en el mismo liofilizado.

20

Toda, o parte de la L-cisteína particular de acuerdo con la invención y células de *B. animalis lactis* pueden ser físicamente separadas pero en colección ("kit-de-partes") en los gránulos congelados distintos y/o liofilizado(s) distintos. El inóculo de la

25

invención comprende:

- al menos dos gránulos congelados o
- al menos dos liofilizados distintos, o
- al menos un granulo congelado o al menos liofilizado,

5 cada uno contiene, sea cisteína particular de acuerdo con la invención, o células de *B. animalis lactis* de manera que, por cada uno de las pares de entidades físicas (gránulo + gránulo; o liofilizado + liofilizado distinto; o gránulo + liofilizado):

- una de las dos entidades físicas contienen toda o una
10 parte de la L-cisteína particular sin contener células de *B. animalis lactis*, y

- otra de las dos entidades físicas que contiene células de *B. animalis lactis* sin contener la L-cisteína particular.

Bien entendido el conjunto de la cantidad de L-cisteína
15 particular de acuerdo con la invención y el conjunto de *B. animalis lactis* contenidas en el inóculo pueden también contenerse o presentarse en forma de gránulo(s) distinto(s) y/o liofilizado(s) distinto(s).

El inóculo de cuerdo con la invención puede comprender o
20 puede ser constituido por los siguientes elementos:

- a) gránulos congelados que contienen L-cisteína particular de acuerdo con la invención y células de *B. animalis lactis*,
- b) liofilizado que contiene L-cisteína particular de
25 acuerdo con la invención y células de *B. animalis*

lactis.

- 5
- c) gránulos congelados que contienen L-cisteína particular de acuerdo con la invención, pero no contienen células de *B. animalis lactis* y gránulos congelados que contienen células de *B. animalis lactis* pero no contienen L-cisteína particular de acuerdo con la invención,
- 10
- d) liofilizado que contiene L-cisteína particular de acuerdo con la invención, pero no contiene células de *B. animalis lactis* y liofilizado que contiene células de *B. animalis lactis* pero no contiene L-cisteína particular de acuerdo con la invención,
- 15
- e) gránulos congelados que contienen L-cisteína particular de acuerdo con la invención, pero no contienen células de *B. animalis lactis* y liofilizado que contienen células de *B. animalis lactis* pero no contienen L-cisteína particular de acuerdo con la invención,
- 20
- f) liofilizado que contiene L-cisteína particular de acuerdo con la invención, pero no contiene células de *B. animalis lactis* y gránulo que contiene células de *B. animalis lactis* pero no contiene L-cisteína particular de acuerdo con la invención,
- 25
- g) o una mezcla de al menos dos formulaciones presentadas en a) a f) anteriores.

El inóculo de acuerdo con la invención contiene cisteína en forma libre (es decir no enlazada a otros ácidos aminados por los enlaces peptídicos), que resulta de una selección particular operada por los inventores.

5 En efecto, la cisteína en forma libre es una L-cisteína libre que, entre otros, es en forma que permite obtener gránulos y/o liofilizado(s) que son tales que el pH de la solución obtenido por:

- descongelación del (de los) gránulo(s) (por ejemplo, colocando los gránulos a baño María a 37°C durante 3 minutos
10 bajo agitación manual), y/o

- re-solubilización del (de los) liofilizado(s) en una proporción de 1 a 2 gramo(s) de liofilizado(s) por 8 a 10ml de H₂O (por ejemplo, con rehidratación durante 30 minutos a 25°C bajo agitación magnética),

15 es al menos igual a 4.

Para este hecho se elegirá de preferencia una L-cisteína en forma tal que el pH de una solución constituida de 1 a 1.5 gramos de esta cisteína en 50 a 100 ml de H₂O es al menos igual a 4.

Un ejemplo de una cisteína apropiada es la L-cisteína
20 comúnmente nombrada L-cisteína base en donde la formula en forma reducida es HSCH₂CH(NH₂)CO₂H.

Un ejemplo de una cisteína no apropiada es la cisteína-HCl (clorhidrato de cisteína o clorhidrato monohidratado de cisteína).

De preferencia ninguno de los compuestos utilizados para
25 fabricar inóculo de acuerdo con la invención es la forma

clorhidratada.

La L-cisteína particular de acuerdo con la invención que se contiene en el inoculo de la invención no es una cisteína ácida, tal como clorhidrato de L-cisteína ($\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}\cdot\text{HCl}$) o el
5 clorhidrato monohidratado de L-cisteína ($\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}\cdot\text{HCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$).

El clorhidrato monohidratado de L-cisteína no es una cisteína particular de acuerdo con la invención, puesto que una solución constituida por 1.0g de clorhidrato monohidratado de L-
10 cisteína de 100 ml de H_2O con un pH de 1.5 a 2.0.

Asimismo la descongelación de gránulos congelados o la resolubilización de un liofilizado que podría(n) producirse a partir de una cisteína que no sería una cisteína particular de acuerdo con la invención, resultará en una solución en donde el pH es
15 muy ácido, más particularmente en donde el pH es inferior a 4 generalmente inferior a 3.5.

La mayoría de la cisteína en forma muy ácida son cisteínas en forma de sales, tales como el clorhidrato de L-cisteína o el clorhidrato monohidratado de L-cisteína. El ion o los iones que
20 participan en esta sal se encuentran en el granulado congelado o liofilizado. La presencia de este ion o estos iones puede a veces constituir un marcador del uso de una cisteína que es combinada con una entidad ácida (la cual tiene generalmente como función aumentar la solubilidad de la cisteína). Esto es, por ejemplo como
25 el caso con los iones de cloro contenidos en el clorhidrato de L-

cisteína o el clorhidrato monohidratado de L-cisteína. En efecto si una cisteína ácida de clorhidrato de L-cisteína, o el clorhidrato monohidratado de L-cisteína es utilizado se puede constatar que el gránulo o el liofilizado contiene una fuerte cantidad de cloruro (Cl), siendo el hecho que el clorhidrato monohidratado de L-cisteína contiene más de 19% de cloruro, y que la L-cisteína base contiene en general menos de 0.5% más particularmente menos de 0.40%. La presencia fuerte de cloruro en el gránulo o el liofilizado puede también constituir de un marcador indirecto del uso de una cisteína que no es una cisteína base. Asimismo, la forma de cisteína utilizada en un inóculo de acuerdo con la invención aportara generalmente menos de 60 microgramos de iones de cloro por gramo de gránulos con 16-17% de materia seca.

De esta manera el primer criterio que se aplica es el del pH. La medida del pH constituye en efecto el criterio directo de elección de la presencia de una cisteína particular de acuerdo con la invención: el pH de gránulos descongelados, en donde el liofilizado re-solubilizado es ahora al menos igual a 4. El mismo es, al menos igual a 5, por ejemplo entre 5 y 6.5. De preferencia este pH no rebasa el pH de 8.

Un pH que es al menos igual a 4 y mas alto igual a 8 no es estresante para *B. animalis lactis*. *B. animalis lactis* puede ahora colocarse en mezcla en la solución de cisteína sin pasar por el estrés y ser formulada en gránulos congelados o liofilizados que

integran cisteína y células de *B. animalis lactis* en la estructura física sólida. El inóculo de *B. animalis lactis* que, en resultado contiene células de *B. animalis lactis* que son en buen estado fisiológico y/o metabólico, y que responde rápidamente a la
5 activación ejercida por la cisteína.

Un gránulo congelado o liofilizado "integrado" de la invención que contiene a la vez células de *B. animalis lactis* y L-cisteína particular de acuerdo con la invención, es un inóculo de *B. animalis lactis* particularmente perfeccionado en la medida en
10 donde anticipa integrar un activador de *B. animalis lactis* en su estructura sin alterar el estado fisiológico y/o el metabolismo de células de *B. animalis lactis*.

La selección de la L-cisteína particular de acuerdo con la invención permite obtener gránulos y/o liofilizados que son más
15 eficaces lo que no son los gránulos y/o liofilizados formulados con L-cisteína en forma muy ácida, tal como el clorhidrato de L-cisteína.

Eso es igualmente la selección que permite integrar la cisteína de manera eficaz en los mismos gránulos congelados o
20 en el mismo liofilizado. En efecto puesto que se utiliza cisteína en su forma muy ácida, de manera que el clorhidrato de L-cisteína, para formular un gránulo congelado o un liofilizado que comprende a la vez cisteína-HCl y células de *B. animalis lactis* el granulo integrado o el liofilizado integrado resultante es un
25 inóculo poco eficaz de *B. animalis lactis* comparado con el mismo

gránulo o liofilizado obtenido a partir de L-cisteína particular de acuerdo con la invención.

De acuerdo con una modalidad preferida de la invención, el inóculo de la invención no comprende cisteína muy ácida, y más particularmente no contiene clorhidrato de L-cisteína, y/o no es
5 fabricado con la cisteína similar.

El inóculo de acuerdo con la invención no es más destinado a comprender cisteína. De preferencia no se agregará cisteína en el inóculo. Por lo consiguiente trazos de cisteína pueden y se
10 encuentran, pero ellas serían el hecho por el ejemplo de una oxidación de la cisteína contenida en el inóculo.

Ventajosamente la L-cisteína particular de acuerdo con la invención es presente en el inóculo en una cantidad de:

- un gramo por 1.10^{14} ufc de la "al menos una" cepa de
15 *B. animalis lactis* (o si hay más de las cepas de *B. animalis lactis*),

- un gramo por $3.5.10^{10}$ ufc de la misma y de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* (o si hay más de las cepas de *B. animalis lactis*):

20 y/o en una cantidad de

- 0.01 miligramo por millar de ufc de la misma y al menos una cepa de *B. animalis lactis* (o si hay más de las cepas de *B. animalis lactis*),

- 30 miligramos por millar de ufc de la misma y de la "al
25 menos una" cepa de *B. animalis lactis* (o si hay más de las cepas

de *B. animalis lactis*).

En la presente solicitud todas las masas de cisteína son calculadas con base en una cisteína de formula $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$.

5 Preferiblemente la L- cisteína particular de acuerdo con la invención es presente en el inoculo en la cantidad de:

- un gramo $0.2 \cdot 10^{14}$ ufc de la "al menos una" cepa *B. animalis lactis* (o si hay más de las cepas de *B. animalis lactis*)

- un gramo por $10 \cdot 10^{10}$ ufc de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* (o si hay más de las cepas de *B. animalis lactis*);

y/o una cantidad de:

- 0.05 miligramos por millar de ufc de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* (o si hay más de las cepas de *B. animalis lactis*);

- 10 miligramos por millar de ufc de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis*.

De acuerdo con una modalidad particular de la invención, la L-cisteína de acuerdo con la invención es presente en el inoculo en una cantidad de 4.90 mg a 144 mg por $5 \cdot 10^9$ a $5 \cdot 10^{11}$ ufc de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis*.

Preferiblemente la L-cisteína particular de acuerdo con la invención es presente en el inoculo en una cantidad desde 25 a 50 mg, más preferiblemente desde 30 a 40 mg, aún más preferiblemente desde 31 a 39 mg, por ejemplo aproximadamente

31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 mg, muy preferiblemente de 35 a 37 mg por ejemplo aproximadamente 35, 36, 37 mg, de manera particular preferida aproximadamente 36.9 mg por $5 \cdot 10^9$ a $5 \cdot 10^{11}$ ufc de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis*.

5. Preferiblemente el numero de ufc de *B. animalis lactis* de es de $5 \cdot 10^9$ a $5 \cdot 10^{11}$ ufc, más preferiblemente de $2 \cdot 10^{10}$ a $5 \cdot 10^{11}$ ufc de *B. animalis lactis* más preferiblemente de $2 \cdot 10^{10}$ a $1 \cdot 10^{11}$ ufc de *B. animalis lactis* aún más preferiblemente de $2 \cdot 10^{10}$ a $7 \cdot 10^{10}$ ufc de *B. animalis lactis*.

10. Ventajosamente, 1 gramo de gránulos de acuerdo con la invención que contienen de 16-17% de materia seca (materia seca a 105°C durante al menos 40 minutos) contiene desde $5 \cdot 10^9$ a $5 \cdot 10^{11}$ ufc de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis*.

15. Ventajosamente 1 gramo de gránulos de acuerdo con la invención que contienen de 16-17% de materia seca (materia seca a 105°C durante al menos 40 minutos) contiene 4.90 mg a 144 mg de la L-cisteína particular de acuerdo con la invención, de preferencia L-cisteína base.

20. Ventajosamente una cantidad de 160 a 170 miligramos de un liofilizado de acuerdo con la invención comprende desde $5 \cdot 10^9$ a $5 \cdot 10^{11}$ ufc de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis*.

Ventajosamente una cantidad de 160 a 170 miligramos de un liofilizado de acuerdo con la invención contiene desde 4.90 mg a 144 mg de la L-cisteína particular de acuerdo con la invención.

25. Para denominar las colonias que forman la unidad (ufc) de

B. animalis lactis, se puede utilizar cualquier técnica que el experto en materia puede encontrar apropiada, por ejemplo, el método de numeración de bífido bacterias descritas en Grand y col. 2003 (Eur. Food Res. Technol. 217 90-92). De preferencia se utiliza el método de S.N. Thitaram, G.R. Siragusa y A. Hinton, 2005 (Jr Letters in Applied Microbiology; Volumen 41 Pagina 355 – Octubre 2005; *Bifidobacterium-selective isolation and enumeration from Chicken caeca by a modified oligosaccharide antibiotic-selective agar medium*”).

Para dosificar la cisteína contenida en un líquido se puede utilizar cualquier técnica que el experto en la materia encuentre apropiada, por ejemplo, la cromatografía en fase gaseosa enlazada con una espectrometría de masa o una cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a una detección fluorimétrica. Se puede igualmente dosificar la cisteína con la ayuda de un analizador de ácidos aminados tales como L-8800 *High Speed Amino Acid Analyzer* (Hitachi High Technologies).

De preferencia el inóculo de acuerdo con la invención no contienen más de 0.5% (p/p) de levadura, de extracto de levadura o de autolisato de levadura.

Preferiblemente, el inóculo de acuerdo con la invención no contiene más de 0.5% (p/p) de levadura, de extracto de levadura o de autolisato de levadura. Muy preferiblemente, el inóculo no contiene levadura, extracto de levadura o autolisato de levadura.

Ventajosamente, la invención permite formular un inóculo de

B. animalis lactis que es muy activo y que genera una población de *B. animalis lactis* en el tiempo (durante la conservación del producto lácteo fermentado a temperatura refrigerada) sin utilizar un conservador en el inóculo y sin agregar un conservador al sustrato lácteo o en el producto lácteo fermentado.

Gracias a la invención, la población de *B. animalis lactis* se encuentra en el producto lácteo fermentado en un estado fisiológico y/o metabólico particularmente sano que le permiten mantenerse a un nivel fuerte.

El inóculo de la invención contiene al menos una cepa de *B. animalis lactis* por ejemplo la cepa I-2494 o la cepa BB12® de Chr. Hansen.

El inóculo de la invención puede también contener más cepas de *B. animalis lactis*, por ejemplo, la cepa I-2494 y la cepa BB12® de Chr. Hansen.

El inóculo de acuerdo con la invención puede, entre otras, contener al menos una cepa de bacteria láctica diferente a la *B. animalis lactis*.

La "al menos otra" cepa de bacteria láctica puede ser presente en los gránulos y liofilizado(s) que contienen células de *B. animalis lactis* y/o L-cisteína particular de acuerdo con la invención.

La "al menos otra" cepa de bacteria láctica puede ser presente en una estructura física distinta a la que contiene células de *B. animalis lactis*. Esta estructura física distinta puede,

por ejemplo, ser una estructura sólida tal como los gránulos congelados o un liofilizado que están en mezcla con los gránulos y/o liofilizado(s) de *B. animalis lactis* y L-cisteína particular de acuerdo con la invención y que son separadas pero en colección ("kit-de-partes"). Esta "al menos otra" cepa de bacteria láctica puede estar presente en forma de gránulos congelados o de un liofilizado que son distintos de los gránulos liofilizados de *B. animalis lactis* y de la cisteína particular de acuerdo con la invención.

10 Esta bacteria láctica puede ser una cepa de *Bifidobacterium* una cepa de un género diferente.

 Esta cepa de género diferente puede ser una cepa con función prebiótica, por ejemplo, al menos una cepa elegida por las cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus thamnusus*,
15 *Lactobacillus casei*.

 Esta cepa de género diferente puede ser una cepa con función técnica tal como *S. thermophilus* y/o *L. bulgaricus*.

 Ventajosamente el inóculo de acuerdo con la invención contiene en los gránulo(s) y/o liofilizado(s) de *B. animalis lactis* y
20 L-cisteína particular, un inóculo de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*, por ejemplo, en forma de gránulo(s) congelado(s) y/o liofilizado(s) adaptado a la inoculación directa.

 De manera preferible, el inóculo de acuerdo con la invención contiene varias cepas diferentes de *B. animalis lactis*, por
25 ejemplo al menos dos, al menos tres, al menos cuatro cepas

diferentes a *B. animalis lactis*.

Ventajosamente estas otras cepas son al menos una cepa *S. thermophilus* (por ejemplo la cepa I-1630 disponible por la CNCM) y al menos dos cepas de *L. bulgaricus* (por ejemplo, las cepas I-1632 e I-1519 disponible por la CNCM). Un inóculo similar puede presentarse en forma de una mezcla o de una colección "kit-de-partes" de gránulos congelados y/o liofilizado(s) que contienen *B. animalis lactis* y L-cisteína particular de acuerdo con la invención y gránulos congelados y/o liofilizados que contienen *S. thermophilus* y/o *L. bulgaricus*. El conjunto es ahora especialmente adaptado a la inoculación directa de un sustrato lácteo en vista de su transformación por fermentación láctica acidificante simbiótica de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus* y por fermentación de *B. animalis lactis*, y una leche fermentada que tiene alto valor probiótico y que mantiene su alto valor probiótico después de la conservación en el medio refrigerado.

La presente solicitud es igualmente relativa a un gránulo integrado de acuerdo con la invención así como a un liofilizado de acuerdo con la invención.

Como está indicado y descrito anteriormente, y/o en parte los ejemplos que siguen, un gránulo o liofilizado integrado de acuerdo con la invención comprende al menos una cepa de *B. animalis lactis* y L-cisteína particular de acuerdo con la invención, en las dosis y/o proporciones indicadas. De preferencia, un gránulo similar o liofilizado no comprende cisteína en su forma

muy ácida, como monocloruro de L-cisteína.

La presente solicitud es también relativa a un gránulo congelado que comprende al menos una cepa de *B. animalis lactis* y L-cisteína que no está enlazada a otros ácidos aminados por enlace peptídico, la L-cisteína estando en forma tal que el pH de la solución obtenido por descongelación del (de los) gránulo(s) es al menos igual a 4, generalmente superior a 5.

La presente solicitud es también relativa a un liofilizado que comprende al menos una cepa de *B. animalis lactis* y L-cisteína que no es enlazada a otros ácidos aminados por enlace peptídico, la L-cisteína estando en forma de una cisteína de tal forma que el pH de la solución obtenido después de la re-solubilización del (de los) liofilizado(s) en una proporción de 1 a 2 gramo(s) de liofilizado(s) por 8 a 10 mL de H₂O, es al menos igual a 4, generalmente superior a 5.

De preferencia, el pH del gránulo o liofilizado es inferior a 8 (pH de la solución obtenido después de la descongelación del gránulo, o re-solubilización del liofilizado).

La invención es igualmente relativa a los usos del inóculo de acuerdo con la invención.

La invención es más particularmente relativa a sus usos en el cuadro de una fermentación láctica acidificante, aún más particularmente a sus usos en el cuadro de la fabricación de productos lácteos fermentados destinados al consumo humano.

La invención es también relativa a cualquier método que

utiliza al menos un inóculo y/o al menos un gránulo o liofilizado de acuerdo con la invención.

La invención se refiere, más particularmente, a un método de estimulación de crecimiento y/o del metabolismo de *B. animalis lactis* en el sustrato lácteo, que utiliza al menos un inóculo y/o al menos un gránulo, y/o al menos un liofilizado de acuerdo con la invención.

Este método de estimulación presenta la ventaja de estimular *B. animalis lactis* de manera muy eficaz. Como se presentó y se ilustró anteriormente, el método de estimulación de acuerdo con la invención permite producir una población de *B. animalis lactis* en donde el metabolismo y/o el crecimiento permiten el mantenimiento de células vivas de *B. animalis lactis* con el tiempo.

Para utilizar este método se usa inóculo en dosis y/o proporciones como las indicadas anteriormente y/o descritas en los ejemplos y las figuras que siguen.

Ventajosamente se utiliza el inóculo y/o gránulo, y/o liofilizado de acuerdo con la invención en cantidades que le dan al sustrato lácteo:

- 5 a 20 mg de cisteína por L de sustrato lácteo, preferiblemente de 6 a 15 mg/L, más preferiblemente de 7 a 11 mg/L, y
 - 10^9 a 10^{11} ufc de *B. animalis lactis* por L de sustrato,
- 0.4. 10^{10} a 1. 10^{11} ufc de *B. animalis lactis*, más preferiblemente de

0.4.10¹⁰ a 1.2.10¹⁰ ufc de *B. animalis lactis*, muy preferiblemente, de 0.4.10¹⁰ a 1.10¹⁰ ufc de *B. animalis lactis*.

El sustrato inoculado es de preferencia mantenido en condiciones de temperatura y atmosfera favorables al metabolismo de *B. animalis lactis*, por ejemplo de 37°C a 42°C, en un recipiente cerrado.

La invención se refiere igualmente a un método de producción de un producto lácteo fermentado, preferiblemente de un producto lácteo obtenido por fermentación láctica, la cual fermentación láctica comprende al menos la fermentación simbiótica *S. thermophilus* - *L. Bulgaricus*, en medida de la fermentación operada por *B. animalis lactis*.

El método de la invención comprende el uso de al menos un inóculo y/o al menos un granulo, y/o al menos un liofilizado de acuerdo con la invención. El producto lácteo fermentado es un producto lácteo fermentado con alto valor probiótico, puesto que contiene un fuerte contenido de *B. animalis lactis*, y conserva un alto contenido después de su conservación en atmosfera refrigerada.

Este método de producción presenta la ventaja de activar y /o estimular *B. animalis lactis* de manera muy eficaz. El mismo presenta igualmente la ventaja de no ejercer efecto negativo en la simbiosis de *S. thermophilus* y *L. bulgaricus*.

Como se ha presentado e ilustrado anteriormente el método de la producción de la invención permite producir una población

de *B. animalis lactis* en donde el metabolismo y/o el crecimiento permite el mantenimiento de células vivas de *B. animalis lactis* con el tiempo.

Para utilizar este método, se toma inóculo en dosis y/o
5 proporciones tales como las indicadas anteriormente y/o descritas en los ejemplos y figuras que siguen.

Ventajosamente se toma inóculo y/o gránulo, y/o liofilizado de acuerdo con la invención en cantidades que le dan al sustrato lácteo:

10 - 5 a 20 mg de cisteína por L de sustrato lácteo, preferiblemente de 6 a 15 mg/L, más preferiblemente de 7 a 11 mg/L, y

- 10^9 a 10^{11} ufc de *B. animalis lactis* por L de sustrato, de preferencia $0.4 \cdot 10^{10}$ a $1 \cdot 10^{11}$ ufc de *B. animalis lactis*, más
15 preferiblemente de $0.4 \cdot 10^{10}$ a $1.2 \cdot 10^{10}$ ufc de *B. animalis lactis*, muy preferiblemente de $0.4 \cdot 10^{10}$ a $1 \cdot 10^{10}$ ufc de *B. animalis lactis*.

Dosis de 0.05 a 1 gramo de gránulos integrados de acuerdo con la invención, por ejemplo, de alrededor 0.2 g de gránulos
20 integrados de acuerdo con la invención, son ejemplos de dosis apropiadas por 1 litro de sustrato lácteo.

El sustrato inoculado es de preferencia mantenido en condiciones de temperatura y de atmosfera favorables al metabolismo de *B. animalis lactis*, por ejemplo, de 37°C a 42°C,
25 en un recipiente cerrado):

Al menos una cepa de *B. animalis lactis* tiene el papel de cepa probiótica. Estando así, esta "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* debe poder llevar a cabo una fermentación acidificante en el sustrato lácteo. La "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* no es simplemente agregada al sustrato o producto lácteo sin que se le permita llevar a cabo una fermentación acidificante, como lo sería un simple aditivo.

Ventajosamente, el método de producción de producto lácteo fermentado puede comprender el uso de al menos otra cepa de al menos una cepa de *B. animalis lactis*.

Esta otra cepa es de preferencia una cepa de bacteria láctica.

La "al menos otra" cepa de bacteria láctica tiene, notablemente como función de llevar a cabo una fermentación láctica acidificante. La misma es inoculada en el sustrato lácteo de manera que pueda conducir a una fermentación láctica acidificante, es decir en un momento y en cantidades que le permiten efectivamente llevar a cabo una fermentación láctica acidificante.

El método de fermentación de la invención corresponde a una fermentación mixta llevada a cabo por la "al menos una" cepa de bacteria láctica y por la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* y no un simple método de fermentación láctica en la cual *B. animalis lactis* sería agregado como un simple aditivo sin acción fermentativa detectable.

La "al menos otra" cepa de bacteria láctica y la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* se encuentran juntas en el sustrato lácteo.

De acuerdo con un aspecto ventajoso de la invención, el método de producción puede no ser un método de dos etapas ("two-step process"): la agregación de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* y de las "al menos otras" cepas eventuales de bacterias lácticas puede elaborarse en el mismo tiempo, o al menos sensible posible con la misma etapa del método, es decir principio del método sin tener que esperar y controlar que la fermentación llevada a cabo por unas cepas sea alcanzar un cierto estado, para decidir agregar o no las cepas.

La fermentación del sustrato lácteo es llevada a cabo a una temperatura apropiada a las cepas utilizadas y es generalmente llevada a cabo a una temperatura comprendida entre 36°C y 42°C.

Esa fermentación es generalmente llevada a cabo hasta que se obtiene un pH obtenido entre 4.8 y 4.2.

El método de producción de producto lácteo fermentado de acuerdo con la invención puede comprender una o más etapas diferentes, por ejemplo, una o más etapas adicionales elegidas entre las etapas clásicas de producción de producto lácteo fermentado referido.

Se puede tratar por ejemplo de una o más etapas entre las siguientes etapas:

25 - la preparación de un sustrato lácteo,

- el tratamiento térmico del sustrato lácteo (tratamiento térmico al menos equivalente a la pasteurización, por ejemplo, 95°C durante 5 minutos),

- una o más inoculaciones del sustrato lácteo,

5 - la conducta de al menos una fermentación láctica del sustrato inoculado en condiciones adaptadas a las cepas inoculadas (hasta un pH de 4.8 a 4.2. generalmente),

- eventualmente agregar aromas, frutas, edulcorantes, colorantes, conservadores,

10 - eventualmente alisado o mezclado del producto fermentado,

- acondicionamiento del producto fermentado por ejemplo en recipientes herméticos,

- la conservación del producto lácteo fermentado en
15 medio refrigerado.

El inóculo de acuerdo con la invención permite obtener una población de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* (o, si hay más de las cepas de *B. animalis lactis*), que es de al menos $5 \cdot 10^7$ ufc por gramo de producto fermentado al fin de la fermentación, de preferencia de al menos 10^8 ufc por gramo de
20 producto fermentado al fin de la fermentación.

De manera remarcable, el inóculo de acuerdo con la invención presenta la ventaja de permitir obtener una población de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* (o si hay más de
25 las cepas de *B. animalis lactis*) que no baja de $5 \cdot 10^7$ ufc por

gramo de producto fermentado, después de 20 días, de preferencia al menos 30 días de conservación del producto fermentado a una temperatura comprendida entre 4 y 11°C, de referencia, una temperatura comprendida entre 4 y 10°C, más preferida a una temperatura comprendida entre 4y 9°C.

De manera remarcable, el inóculo de acuerdo con la invención presenta la ventaja de permitir obtener una población de la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* (o si hay más de las cepas de *B. animalis lactis*) que no baja de 10^8 ufc por gramo de producto fermentado, después de 20 días, de preferencia al menos 30 días de conservación del producto fermentado a una temperatura comprendida entre 4 y 11°C, de referencia, una temperatura comprendida entre 4 y 10°C, más preferida a una temperatura comprendida entre 4y 9°C: figuras 8 y 9 ilustra el mantenimiento hasta al menos 30 días de conservación a 10°C de la población de *B. animalis lactis* en las leches fermentadas producidas con la ayuda del inóculo de acuerdo con la invención (*S. thermophilus* - *L. bulgaricus* + *B. animalis lactis*), en comparación con las leches fermentadas de muestra en donde la población de *B. animalis lactis* sube rápidamente a partir del 21 día.

En la presente solicitud las masas de producto lácteo fermentado se entienden como siendo la masa de la parte láctea del producto lácteo fermentado.

En la presente solicitud es igualmente relativa al producto

lácteo fermentado.

Un tal producto presenta una población de *B. animalis lactis* que se mantiene debajo de las observadas en los productos de la técnica anterior, aún después de al menos 20 días, de preferencia al menos 30 días de conservación del producto fermentado comprendido entre 4 y 11°C, de preferencia una temperatura comprendida entre 4 y 10°C muy preferiblemente a una temperatura comprendida entre 4 y 9°C.

Su composición difiere necesariamente de los productos de la técnica anterior.

La presente solicitud es relativa a un producto lácteo fermentado que es susceptible de ser obtenido por fermentación láctica y de un sustrato láctico fermentado por medio de al menos un inóculo de acuerdo con la invención hasta un pH generalmente comprendido entre 4.8 y 4.2. De preferencia este inóculo es forma de gránulos congelados integrados y/o un liofilizado integrado de acuerdo con la invención (inóculo en el cual L-cisteína particular es integrado al fermento *B. animalis lactis*). Ventajosamente este inóculo puede, entre otros, comprender al menos una cepa de *S. thermophilus* o al menos una cepa de *L. bulgaricus*.

En la presente solicitud, el acrónimo CNCM se refiere a la Colección Nacional de Cultivos de Microorganismos (CNCM; Institut Pasteur; 25, rue de Docteur Roux; F-75724 PARIS CEDEX 15). Las cepas depositadas bajo la CNCM tienen un número que comienza por "I", tal como "I-2494" (cepa de *B. animalis lactis*);

"I-1630" (cepa de *S. thermophilus*), "I-1632" o "I-1519" (cepas de *L. bulgaricus*).

El término "que comprende", con el cual "que incluye" o "que contiene" es sinónimo, es un término abierto, y no se excluye por la presencia de uno o más elementos, ingredientes o etapas de método adicional que no serían explícitamente indicadas, tanto como el término "que consiste de" o "constituido" es un término cerrado, que excluye la presencia de cualquier otro elemento adicional, etapa o ingrediente que no sería explícitamente expuesto. El término "que consiste esencialmente de" o "esencialmente constituido de" es un término parcialmente abierto, que no excluye la presencia de uno o múltiples elemento(s), ingrediente(s) o etapa(s) adicional(es), en la medida en donde este(os) elemento(s), ingrediente(s) o etapa(s) adicional(es) no afectan materialmente las propiedades base de la invención.

Por lo consiguiente, el término "que comprende" (o "comprende (comprenden)") incluye los términos "que consiste de", "constituido", así como los términos "que consiste esencialmente de" y "esencialmente constituido de".

El contenido de cada uno de los documentos, obras o publicaciones que son citadas en la presente solicitud es incorporado por referencia.

Los ejemplos que siguen se citan solamente como ilustración y no limitan la invención de ninguna manera.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: El uso de cisteína-HCl no es adaptado a la fabricación de gránulos nombrados "integrados" que comprenden a la vez cisteína y *B. animalis lactis*.

5 Material y método:

En este ejemplo, se sigue el principio de fabricación de gránulos presentados en la Figura 2.

Las cepas probióticas utilizadas en este ejemplo son las siguientes:

10 - *Bifidobacterium animalis lactis* cepa BB12®
comercializada por Chr. Hansen A/S, Hoersholm, Dinamarca

 - *Bifidobacterium animalis lactis* cepa I-2494 disponible
por la CNCM (fecha de depósito en la CNCM = 20 de junio de
2000); solicitud internacional WO 02/02800 presentada el 4 de
15 julio de 2001 a nombre de Compagnie Gervais Danone, así como
las contrapartes nacionales y regionales de esta solicitud
internacional, más particularmente, por lo que se refiere a las
contrapartes norteamericanas de esta solicitud internacional, ver
notablemente la patente norteamericana US 7,008,785 B2.

20 Llegado el caso, las cepas son descongeladas antes del
uso.

La cisteína utilizada es la cisteína-HCl que es habitualmente
utilizada como aportación de cisteína, por su muy buena
solubilidad (alrededor de 110 g por 100 g de H₂O a 20°C).

25 La cisteína-HCl es hidrocloreuro monohidrato de L-cisteína

(o, monoclórhidrato monohidratado de ácido (R)-2-amino-3-mercaptopropionico). La misma tiene como formula $C_3H_7NO_2S \cdot HCl \cdot H_2O$ (o, L-cisteína $\cdot HCl \cdot H_2O$). Su número CAS es 7048-04-6; ella tiene una masa molar de 175.63.

5 La cisteína-HCl es disponible en el comercio, por ejemplo, por Ajinomoto Aminoscience LLC, Raleigh NC 27610 USA.

El método de producción de gránulos (Figura 2):

50 gramos de cada cepa de *B. animalis lactis* son mezclados con:

- 10 - 15 gramos de cisteína-HCl con 325 g/L (gránulos integrados G4I Cys-HCl), o con
- 15 gramos de agua (gránulos de muestra I-2494 T y BB12 T).

15 La mezcla se hace bajo agitación de manera que se incorpora la solución de cisteína-HCl (o el agua en el caso de muestra).

La formación de gránulos congelados se elabora por goteo de mezcla en azoto líquido. Un dispositivo que comprende varias agujas de jeringas, empalmado a través de un tubo a una bomba peristáltica, es alimentado con mezcla y deja caer las gotas formadas a la salida de las agujas en una bandeja isotérmica rellena de azoto líquido.

20

Se obtienen gránulos congelados de fermento probiótico G4I Cys-HC (gránulos de *B. animalis lactis* I-2494 o BB12® que contienen cisteína-HCL), y gránulos muestra de agua en vez y en

25

el lugar de la cisteína-HCl.

Preparación de mezclas lácteas (=sustratos lácteos):

La mezcla láctea es compuesta de los siguientes ingredientes; leche descremada con 0% materias grasa, crema con 40% de materias grasas y polvo lácteo descremado (PLE) con 33% de proteínas.

Un en primer tiempo, todos los ingredientes son relacionados en conjunto para estandarizar la leche a un nivel proteico (TP) de 4.4%, un nivel de materias grasas (MG) de 3.5% y el nivel de materias secas de 15.8% con agitación del medio durante 60 minutos a alrededor 750 vueltas/min con un agitador HEIDOLPH® para que se re-hidraten las proteínas.

El control de la estandarización es efectuado con un detector infrarojo MILKOSCAN FT 120® de la compañía FOSS®. A continuación, un ejemplo de las cantidades necesarias de cada ingrediente para obtener los puntos determinantes que caracterizan la leche.

Tabla 1

Ingredientes	En %
Leche descremada 0% MG	87.5
Crema con 40% MG	8.7
Proteínas lácteo descremada 33% TP	3.8
Total	100

La leche es ahora calentada a una temperatura de 50°C a

60°C con el fin de derretir los glóbulos de grasa. Una vez que se alcanza la temperatura los 10 litros son homogenizados con MICROFLUDIIZIER®. Eso permite separar los glóbulos de grasa pasando la leche en capilares a través de un escurridor y bajo
5 una presión de 350 bares.

Un baño maría de la compañía MEMMERT® es preparado y mantenido a 103°C. La leche es transferida en 8 botellas de un litro con un peso de esta cantidad por cada botella.

Las botellas son sumergidas hasta debajo del cuello en
10 baño maría a 103° durante 35 minutos, después 10 minutos a 95°C en el mismo baño maría.

Las botellas son enfriadas en un baño de agua fría de flujo continuo y después almacenadas a 4°C en el refrigerador de 12 a 14 horas hasta el uso.

15 Inoculación de mezclas lácteas:

Las botellas con leche son retiradas del refrigerador 45 minutos antes de la inoculación de fermentos y colocadas en baño maría a temperatura de fermentación (37°C).

Cuatro inoculaciones distintas de mezcla láctea son llevadas
20 a cabo:

- gránulos I-2494 G41 Cys-HCl,
- gránulos muestra I-2494 T,
- gránulos BB12 G41 Cys-HCl,
- gránulos de muestra BB12 T.

25 Cada inoculación es realizada con 0.2 gramos de gránulos

por litro de mezcla láctea.

Las botellas son sumergidas en el baño maría (37°C) y la evolución del pH es seguida en el tiempo (aparato CINAC® de la compañía YSEBAERT®).

5 Resultados:

Para *B. animalis lactis* I-2494 así como para *B. animalis lactis* BB12® se observa una degradación del estado fisiológico de probiótico en presencia de cisteína-HCl en los gránulos (tiempo fisiológico = tiempo necesario para las bacterias para reducir el pH de 0.08 unidad pH; lo que da una medida a la reanudación de la actividad metabólica de estas bacterias).

Estos resultados son ilustrados en la figura 3 (I-2494 G4I, comparado con I-2494 T).

La actividad del probiótico *B. animalis lactis* es muy afectada por la agregación de cisteína-HCl en los gránulos de probiótico (aumento de Ta).

La cisteína-HCl no es una fuente de cisteína satisfactoria para la fabricación de gránulos integrados que comprende *B. animalis lactis* y cisteína en los mismos gránulos y que son destinadas a la fabricación de productos lácteos fermentados con alto valor probiótico.

La solución integrada (gránulos de *B. animalis lactis* + cisteína) no puede ser utilizada con cisteína-HCl porque convierte al fermento probiótico en un impropio con actividad metabólica correcta.

En vista de estos resultados se puede observar que el pH de una solución de cisteína-HCl es inferior a 3.5; más particularmente el pH de la solución de cisteína-HCl de un gramo en 100 ml de H₂O y de 1.5 a 2.0, y que el probiótico *B. animalis lactis* es particularmente sensible al pH bajo mismo porque el tiempo de contacto es reducido.

Conviene identificar una fuente de cisteína asimilable por *B. animalis lactis* adaptada al consumo humano y que representa en solución un pH no estresante por *B. animalis lactis*.

10 **Ejemplo 2:** La selección de una L-cisteína base permite alcanzar producir gránulos "integrados" muy eficaces sin prestar atención a los problemas con relación a la escasa solubilidad de esta forma de cisteína.

15 Se procede de manera comparable a lo que esta descrito en el ejemplo 1 anteriormente pero seleccionando la L-cisteína base (L-cisteína; C₃H⁷NO₂S; número CAS: 52-90-4; masa molar: 121.16) en lugar de la cisteína-HCl.

La L-cisteína base es notablemente disponible por Ajinomoto Aminoscience LLC, Raleigh NC 27610, USA.

20 La solubilidad de esta cisteína base es de 16 g por 100 g de H₂O a 20°C.

El pH de una solución que contiene 1.15g de cisteína base por 50 ml de H₂O es de 4.5. a 5.5.

25 Se prepara la solución madre de cisteína base con 160 g/l y se mezclan 3g de esta solución madre con 10 gramos de fermento

de *B. animalis lactis* (*B. animalis lactis* cepa I-2494 o cepa BB12®), que se formula en forma de gránulos congelados (I-2494 G4I Cys-base; y BB12 G4I Cys-base), como se describe en el ejemplo 1 anterior.

5 Los gránulos de muestra I-2494 T y BB12®T son preparados utilizando 3 gramos de agua en lugar de la cisteína base.

La esquema de fabricación de estos gránulos se presenta la figura 4.

10 Cuatro inoculaciones distintas de mezcla láctea son elaboradas con 0.2g/l, como se describe en el ejemplo 1 anterior.

La cantidad de cisteína base contenida en los gránulos G4I es de $(160 \times 3) / (3 + 10) = 36,92$ miligramos de cisteína base por gramo de gránulos congelados G4I.

15 En este ensayo, el contenido de *B. animalis lactis* es de aproximadamente de $2 \cdot 10^{10}$ ufc por gramo de gránulos congelados G4I o G4(I-2494 o BB12).

Se agrega 1.85mg de cisteína $C_3H_7NO_2S$ por millas de ufc de fermento *B. animalis lactis*.

20 La cantidad de cisteína base agregada en la mezcla láctea por los gránulos G4I inoculados con 0.2 g/l es de $0.2 \times 36.92 = 7.384$ mg de cisteína libre por litro de mezcla láctea.

25 Los resultados de incubaciones de la mezcla son de 37°C que muestran que la selección de cisteína base permite evitar que el estado fisiológico del fermento probiótico no se degrada en una medida muy grande.

Estos resultados son ilustrados en la figura 5 (cepa I-2494).

El método "gránulos con cisteína integrada" (gránulos *B. animalis lactis* + cisteína) puede utilizarse con L-cisteína base, puesto que *B. animalis lactis* conserva una actividad metabólica correcta.

Ejemplo 3: Rendimiento de sistema integrado G4I Cys-base de una parte con relación al sistema combinado G4 (gránulos de cisteína distintos a los gránulos de fermento probiótico) y por otra parte con relación al sistema de muestra (gránulos T, sin cisteína).

En este ejemplo se utilizan gránulos de fermento *B. animalis lactis* producidos como se describe en el ejemplo 2, es decir:

- gránulos BB12 T (gránulos de muestra, que contienen *B. animalis lactis* BB12® + agua),

- gránulos BB12 G4I (gránulos integrados que contienen *B. animalis lactis* BB12® + L-cisteína base de aproximadamente 1.85 mg de L-cisteína $C_3H_7NO_2S$ por millar de ufc de fermento probiótico),

- gránulos I-2494 T (gránulos muestra que contienen *B. animalis lactis* I-2494 + agua), y

- gránulos I-2494 G4I (gránulos integrados que contienen *B. animalis lactis* BB12® + L-cisteína base de aproximadamente 1.85mg de cisteína $C_3H_7NO_2S$ por millar de ufc de fermento probiótico).

En este ejemplo se utilizan igualmente fermentos dichos

técnicos que son fermentos de *S. thermophilus* y de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*.

Los fermentos técnicos aquí utilizados corresponden a una mezcla de tres cepas técnicas es decir la cepa I-1630 de *S. thermophilus* y a las cepas I-1632 y I-1519 de *L. bulgaricus* (cepas disponibles por la CNCM).

Los fermentos técnicos son agregados en forma de gránulos congelados.

Los fermentos técnicos son inoculados en la mezcla láctea de aproximadamente $1 \cdot 10^6$ ufc de *S. thermophilus* I-1630 y aproximadamente $2.7 \cdot 10^5$ ufc de *L. bulgaricus* (con 5% de la cepa I-1632 y 95% de la cepa I-1519) por gramo de sustrato lácteo.

Seis mezclas lácteas serán preparadas como se describe en el ejemplo 1 e inoculadas como sigue:

- 15 - mezcla BB12 T y mezcla I-2494 T: mezclas de muestra inoculadas por una mezcla de gránulos de fermentos técnicos y de gránulos BB12 T o I-2494 T, respectivamente (gránulos que contienen probiótico *B. animalis lactis* sin cisteína);
- mezcla BB12 G4 y mezcla I-2494 G4: mezcla del
20 método "combinado", inoculada con la mezcla de muestra, y en los cuales se agregan gránulos de cisteína congeladas;
- mezcla BB12 G4I y mezcla I-2494 G4I: mezclas del
25 método "integrado", e inoculadas por una mezcla de gránulos de fermentos técnicos y de gránulos BB12 14I o I-2494 G4I, respectivamente (gránulos de *B. animalis lactis* que contienen

cisteína en forma integrada).

Las mezclas son inoculadas con 0.5 g/l de mezclas de gránulos (0.3g/l de fermentos técnicos y 0.2 g/l de gránulos de fermento probiótico *B. animalis lactis*).

5 Los gránulos de cisteína de mezcla G4 son agregados, de manera que se obtienen 75 mg/l de cisteína en la mezcla, es decir una cantidad de cisteína comparable a la aportada por los gránulos G4I (valor calculado de 7.384 mg/l de cisteína; ejemplo 2 anterior).

10 Las seis mezclas inoculadas son colocadas en incubación a 37°C como se describe en el ejemplo 1.

La botella es enfriada y almacenada a 20°C. Después el vaciado de las botellas se hace a mano.

15 El acondicionamiento se hace manualmente en pozos de 125 ml y el opérculo es termooscilado con el termooscilador DNV-100-25 PPV-A® de la compañía FESTO®. Los productos son almacenados en cámara fría a 10°C por todo el periodo del ensayo.

20 El pH se mide a través del tiempo de fermentación, así como la evolución de la biomasa (UFC/ml en función del número de días) a través de la fermentación del producto lácteo a 10°C.

Los resultados son ilustrados en las figuras 6 a 9.

La cepa BB12 de *B. animalis lactis* da los resultados comparables con los de la cepa I-2494.

25 En las figuras 6 y 7 (evolución de pH en función del tiempo

en horas), se observa que la presencia de cisteína induce una diferencia de Vmax con relación a la mezcla de muestra. El efecto cisteína es también visible en la cinética de acidificación de *B. animalis lactis*.

Se observa igualmente que la mezcla G4I (L-cisteína base integrada en los gránulos de *B. animalis lactis*) resulta en una cinética comparable con la de la mezcla G4 (gránulos de L-cisteína base distinta a los gránulos de *B. animalis lactis*). La integración del activador de crecimiento es preferiblemente logrado.

En las tablas 2 y 3 a continuación se presentan los valores de algunos parámetros de cinéticas de acidificación presentes en las Figura 6 y 7.

Tabla 2 (cinéticas de acidificación BB12 de la Figura 6:

Fermentos técnicos con	Ta	Vmax	pHm	Tmax	pH0	TpH5.5	TpH5
BB12 T	105	-0.0069	5.97	196	6.43	277	417
BB12 G4	100	-0.0094	5.88	216	6.54	289	425
BB12 G4I	102	-0.0096	5.88	218	6.55	288	423

Tabla 3 (cinéticas de acidificación I-2594 de la figura 7

Fermentos técnicos con	Ta	Vmax	pHm	Tmax	pH0	TpH5.5	TpH5
I-2494 T	97	-0.0060	6.13	185	6.52	309	489
I-2494 G4	95	-0.0095	5.87	218	6.53	309	418
I-2494 G4I	98	-0.0092	5.88	219	6.54	309	419

Ta tiempo de latencia (en min)

Vmax	velocidad máxima (en unidades pH/min)
pHm	pH con la velocidad máxima de acidificación
Tmax	tiempo para llegar a Vmax (en min)
pH0	pH al principio de la fermentación
5 TpH5.5	tiempo para llegar a pH 5.5 (en min)
TpH5	tiempo para llegar a pH 5 (en min).

Las figuras 8 y 9 presentan la evolución de la población celular de fermento probiótico *B. animalis lactis* BB12 en figura 8 y *B. animalis lactis* probiótico en la figura 9 durante la conservación del producto lácteo fermentado (simbiosis *S. thermophilus* *L. bulgaricus* en la medida de *B. animalis lactis*) a una temperatura de 10°C.

Esas curvas de población celular confirman los resultados observados a través de cinéticas de acidificación presentes en las figuras 6 y 7.

La presencia de L-cisteína estimula muy neto la población celular en probiótico y la integración de L-cisteína base es perfectamente obtenida por cada una de las cepas de *B. animalis lactis* representadas.

Asimismo con relación al sistema "combinado" G4[gránulos de fermentos probióticos *B. animalis lactis* + gránulos distintos a la L-cisteína base], los gránulos "integrados" G4I de la cisteína base son también eficaces: ellos permiten llevar a cabo una fermentación láctica simbiótica (*S. thermophilus* + *L. bulgaricus*) que es de al menos de buena calidad y permite generar una

población celular de fermento probiótico *B. animalis lactis* que es de medida totalmente comparable y que se mantiene durante largo tiempo en la conservación de la leche fermentada.

La selección de L-cisteína base ha permitido obtener una integración que resulta del activador de crecimiento específico de *B. animalis lactis*.

Los gránulos "integrados" G4I que contienen un fermento probiótico *B. animalis lactis* y L. cisteína base, y los gránulos "combinados" (gránulos de L-cisteína base distintos a los gránulos de probiótico) son mucho más eficaces que el sistema muestra sin cisteína (gránulos T): ellos permiten llevar a cabo una fermentación láctica simbiótica (*S. thermophilus* L. *bulgaricus*) de calidad menos comparable porque genera una población celular de fermento probiótico *B. animalis lactis* que es mucho más elevada, y que se mantiene mucho más tiempo después de la conservación de la leche fermentada.

REIVINDICACIONES

1. Inóculo que es especialmente adaptado a la inoculación directa de al menos una cepa de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* en un sustrato lácteo, para la transformación del sustrato lácteo en producto lácteo fermentado adaptado al consumo humano,

caracterizado porque el inóculo comprende, en mezcla O en forma de colección:

- cisteína que no es enlazada a otros ácidos aminados por enlace peptídico, y

- al menos una cepa de *B. animalis lactis*.

la cisteína y la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* se encuentran cada una contenidas en, o en forma de gránulo(s) congelado(s) y/o liofilizado(s),

la cisteína siendo, entre otras, L-cisteína base, en donde la formula en forma reducida es $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$, de manera que el pH de la solución obtenido por:

- descongelación del (de los) gránulo(s), y/o

- re-solubilización del (de los) liofilizado(s) en una proporción de 1 a 2 gramo(s) de liofilizado(s) por 8 a 10 mL de H_2O , es al menos igual a 4,

la cisteína siendo presente en el inóculo en una cantidad de:

- 1 gramo por $1 \cdot 10^{14}$ ufc de la "al menos una cepa" de *B. animalis lactis* (o, si hay mas de las cepas de *B. animalis lactis*),

- 1 gramo por $3.5 \cdot 10^{10}$ ufc de la "al menos una cepa" de *B.*

animalis lactis (o, si hay mas de las cepas de *B. animalis lactis*).

2. El inóculo de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la cisteína es una L-cisteína que presenta un pH superior a 4 mientras está en solución.

5 3. El inóculo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque la cisteína no es clorhidrato de cisteína, o clorhidrato monohidratado de cisteína.

10 4. El inóculo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque no comprende clorhidrato de cisteína.

5. El inóculo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque comprende al menos un gránulo congelado y/o un liofilizado, que contiene a la vez:

- toda o una parte de la cisteína, y
- 15 - células de la "al menos una cepa" de *B. animalis lactis*.

6. El inóculo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 caracterizado porque comprende:

- al menos dos gránulos congelados, o
- al menos dos liofilizados distintos, o
- 20 - al menos un granulado congelado y al menos un liofilizado,

y caracterizado porque, por cada una de las pares de entidades físicas:

- una de las dos entidades físicas contiene toda o al menos
- 25 una parte de la cisteína, sin contener células de *B. animalis lactis*, y

- otra de dos entidades físicas contienen células de *B. animalis lactis* sin contener cisteína.

5 7. El inóculo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la cisteína es presente en el inóculo en una cantidad de:

- 0.01 miligramo por millar de *ufc* de la "al menos una cepa" de *B. animalis lactis* (o, si hay más cepas de *B. animalis lactis*),

10 - 39 miligramos por millar de *ufc* de la "al menos una cepa" de *B. animalis lactis* (o, si hay más cepas de *B. animalis lactis*),

8. El inóculo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la cisteína es presente en el inóculo en una cantidad de:

15 - 1 gramo por $0.2 \cdot 10^{14}$ *ufc* de la "al menos una cepa" de *B. animalis lactis* (o, si hay más cepas de *B. animalis lactis*),

- 1 gramo por $10 \cdot 10^{10}$ *ufc* de la "al menos una cepa" de *B. animalis lactis* (o, si hay más cepas de *B. animalis lactis*).

20 9. El inóculo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la cisteína es presente en el inóculo en una cantidad de:

- 0.05 miligramo por millar de *ufc* de la "al menos una cepa" de *B. animalis lactis* (o, si hay más cepas de *B. animalis lactis*),

25 - 10 miligramos por millar de *ufc* de la "al menos una cepa" de *B. animalis lactis* (o, si hay más cepas de *B. animalis lactis*).

10. El inóculo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la cisteína es presente en el inóculo en una cantidad de 4.90 mg a 144 mg por $5 \cdot 10^9$ a $5 \cdot 10^{11}$ ufc de la "al menos una cepa" de *B. animalis lactis*.

5 11. El inóculo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque 1 gramo de los gránulos de 16-17% de la materia seca comprende $5 \cdot 10^9$ a $5 \cdot 10^{11}$ ufc de la "al menos una cepa" de *B. animalis lactis*.

10 12. El inóculo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque los gránulos de 16-17% de la materia seca comprenden de 4.90 mg a 144 mg de la cisteína.

15 13. El inóculo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque no comprende más de 0.5% (p/p) de levadura, de extracto de levadura o de autolisato de levadura.

14. El inóculo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la cepa de *B. animalis lactis* es la cepa I-2494.

20 15. El inóculo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores caracterizado porque comprende, entre otras, al menos una cepa de bacteria láctica diferente a la *B. animalis lactis*.

25 16. El inóculo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la "al menos otra"

cepa de bacteria láctica es presente en la estructura física distinta de la que contiene las células de *B. animalis lactis*.

17. El inóculo de acuerdo con las reivindicaciones 14 o 15, caracterizado porque la "al menos otra" cepa de bacteria láctica
5 comprende al menos una cepa de *S. Thermophilus* y al menos una cepa de *L. bulgaricus*.

18. Gránulo congelado, susceptible de ser extraído de un inóculo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17; caracterizado porque comprende al menos una cepa de *B. animalis lactis* y L-cisteína que no es enlazada a otros ácidos aminados por
10 enlace peptídico, la L-cisteína siendo una cisteína en forma que el pH de la solución obtenido después de la descongelación del (de los) gránulo(s) es al menos igual a 4.

19. Liofilizado, susceptible de ser un inóculo de acuerdo con la invención de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 17, o de ser
15 obtenido de un tal inóculo, caracterizado porque comprende al menos una cepa de *B. animalis lactis* y L-cisteína que no está enlazada a otros ácidos aminados por enlace peptídico, la L-cisteína siendo en tal forma que el pH de la solución obtenido después de la re-solubilización del (de los) liofilizado(s) en una proporción de 1 a 2
20 gramos de liofilizados por 8 a 10 ml de H₂O, es al menos igual a 4.

20. Método de estimulación del crecimiento y/o metabolismo de *B. animalis lactis* en el sustrato lácteo, que comprende:

- la inoculación de un sustrato lácteo por al menos un
25 inóculo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, y/o

por, al menos un gránulo de acuerdo con la reivindicación 18, y/o por al menos un liofilizado de acuerdo con la reivindicación 19, y

- el mantenimiento del sustrato inoculado en condiciones de temperatura y atmosfera favorables al metabolismo de *B. animalis lactis*.

21. Método de producción de un producto lácteo fermentado con alto valor prebiótico, que comprende:

- la inoculación de un sustrato lácteo de al menos un inóculo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, y/o de al menos un gránulo de acuerdo con la reivindicación 18, y/o de al menos un liofilizado de acuerdo con la reivindicación 19, y

- la fermentación del sustrato por el "al menos un" inóculo.

22. Método de acuerdo con la reivindicación 21, que comprende:

- la inoculación de un sustrato lácteo de al menos un inóculo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, y/o por "al menos un" gránulo de acuerdo con la reivindicación 18, y/o por "al menos un" liofilizado de acuerdo con la reivindicación 19, y

- la inoculación del sustrato lácteo de al menos una cepa de *S. Thermophilus* y al menos una cepa de *L. bulgaricus*, y

- la fermentación del sustrato por medio de al menos un inóculo y las cepas de *S. Thermophilus* y *L. bulgaricus*.

23. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, caracterizado porque el inóculo es agregado a un sustrato lácteo en una cantidad que contiene L-cisteína y células de *B.*

animalis lactis en una cantidad de a partir de 7 a 11 mg de L-cisteína por litro de sustrato lácteo, por 10^9 a 10^{11} ufc de células de *B. animalis lactis* por litro de sustrato lácteo.

RESUMEN

La presente solicitud se refiere a un inóculo que es particularmente apropiado para la inoculación directa de al menos una cepa de *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* en un sustrato lácteo, para la conversión del sustrato lácteo en un producto lácteo fermentado. Este inóculo comprende, en forma de mezcla o colección, la L-cisteína base y al menos una cepa de *B. animalis lactis*. La cisteína y la "al menos una" cepa de *B. animalis lactis* son, cada una contenida en, o en forma de gránulos congelados o liofilizados. Ventajosamente, la cisteína es incorporada dentro de los mismos gránulos o el mismo liofilizado como las células de *B. animalis lactis*.

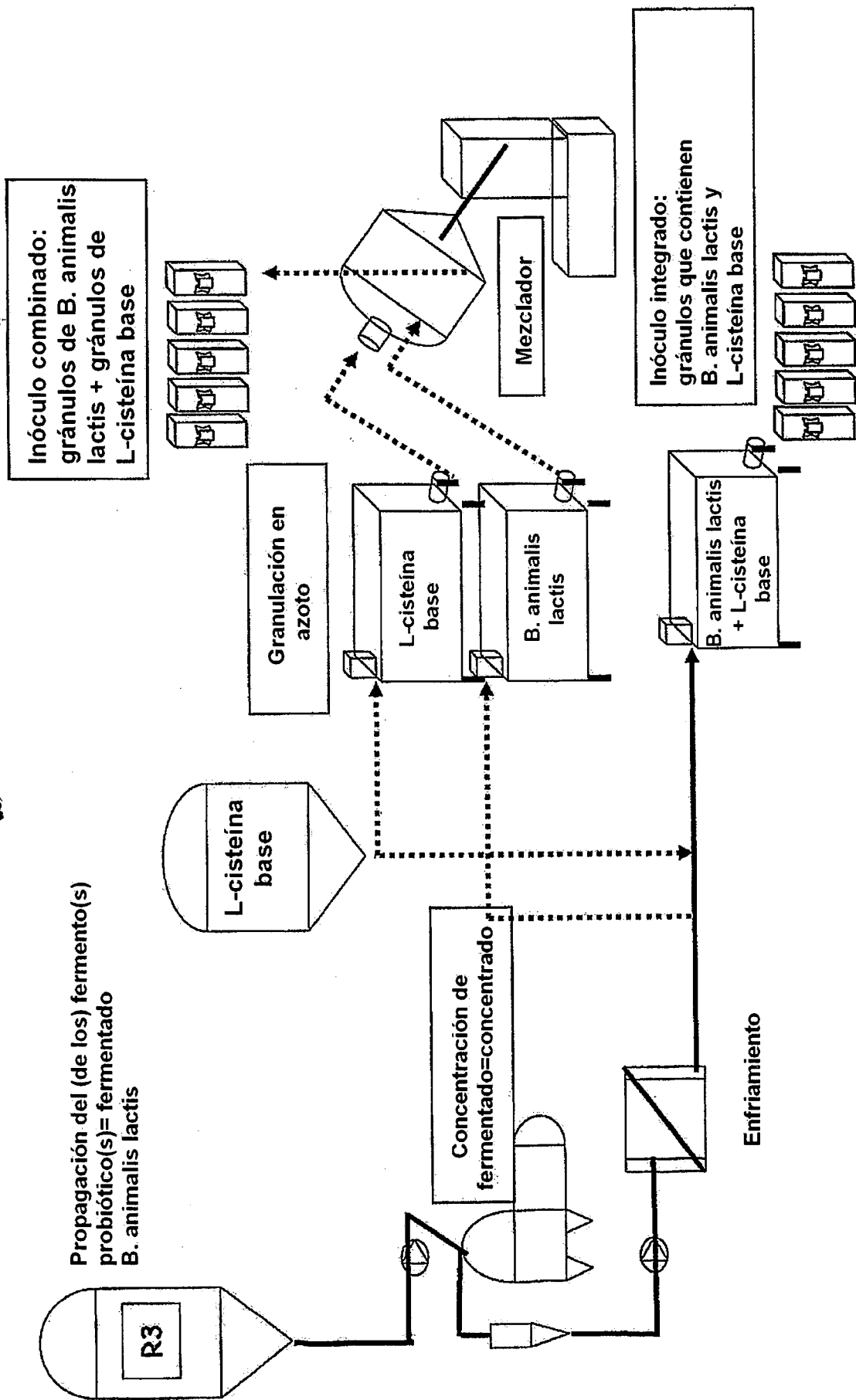


Figura 1

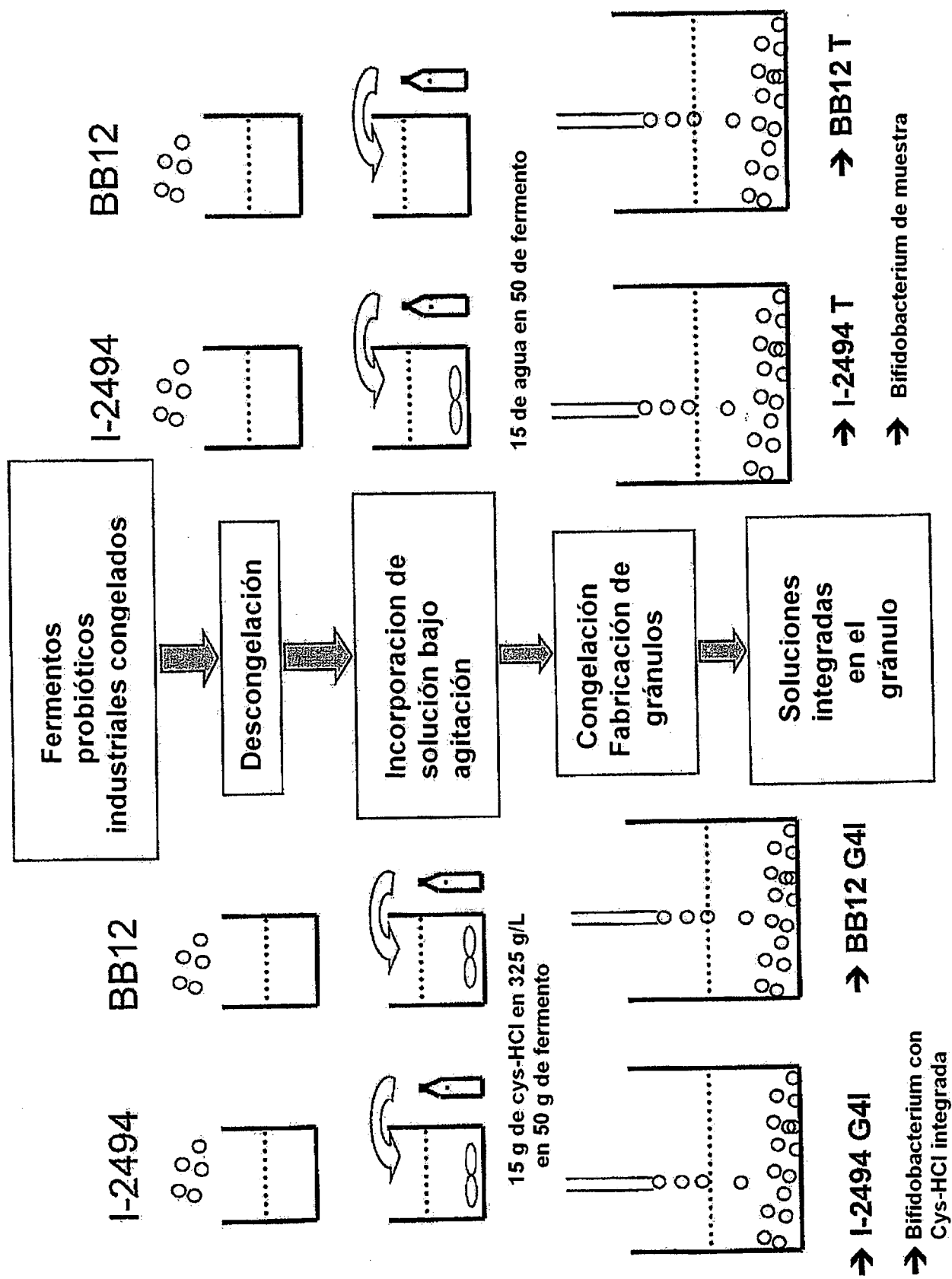


Figura 2

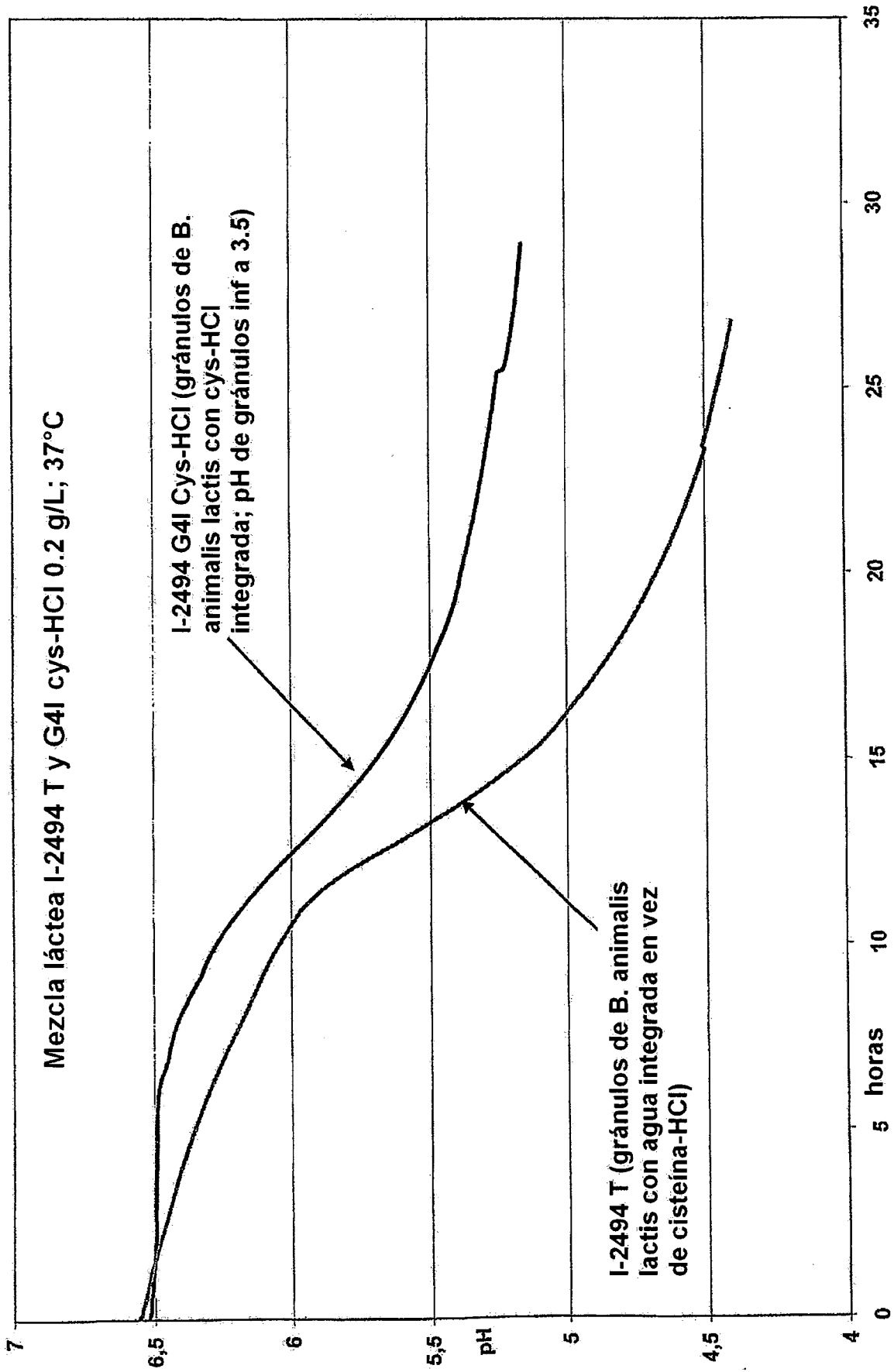


Figura 3

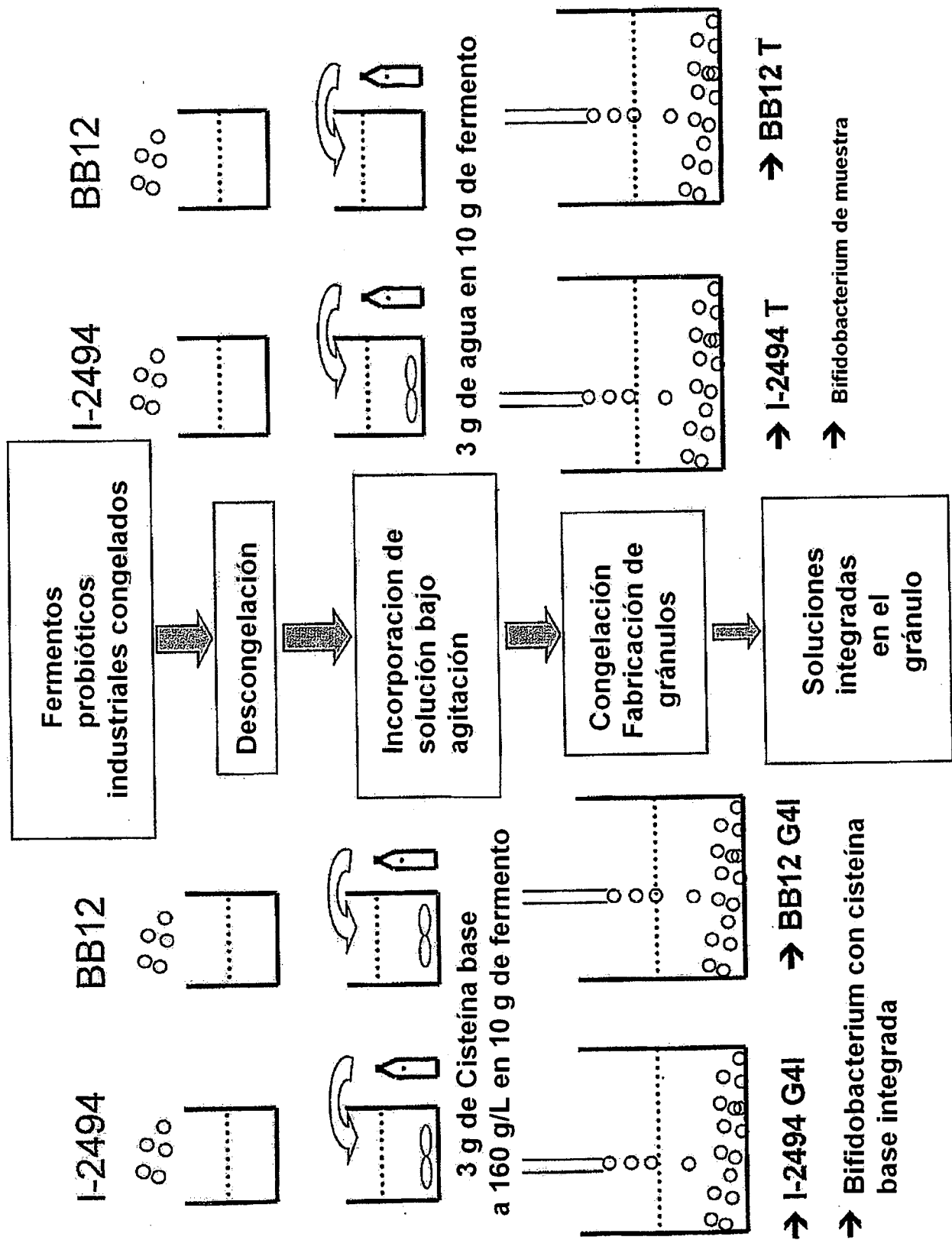


Figura 4

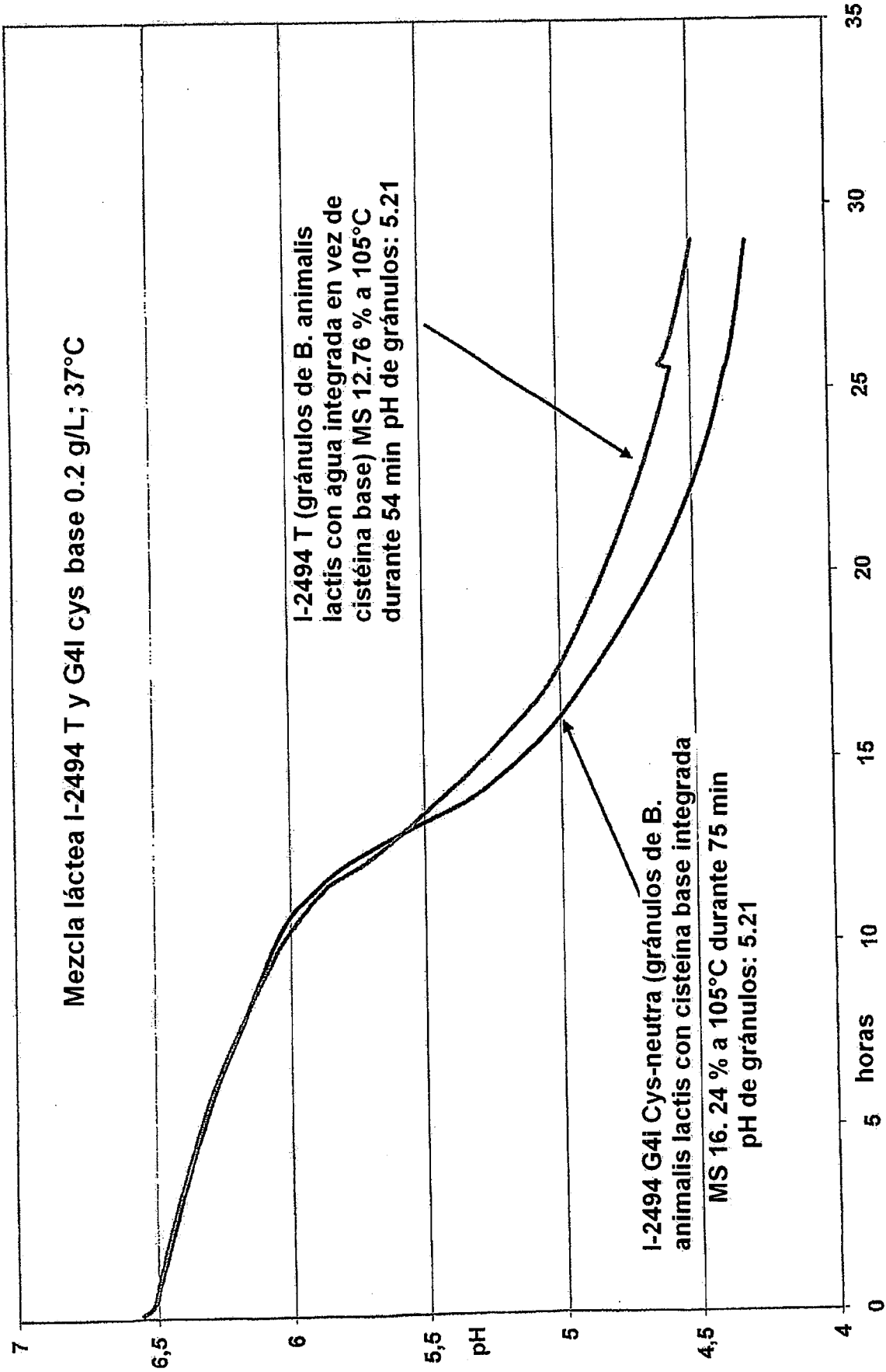


Figura 5

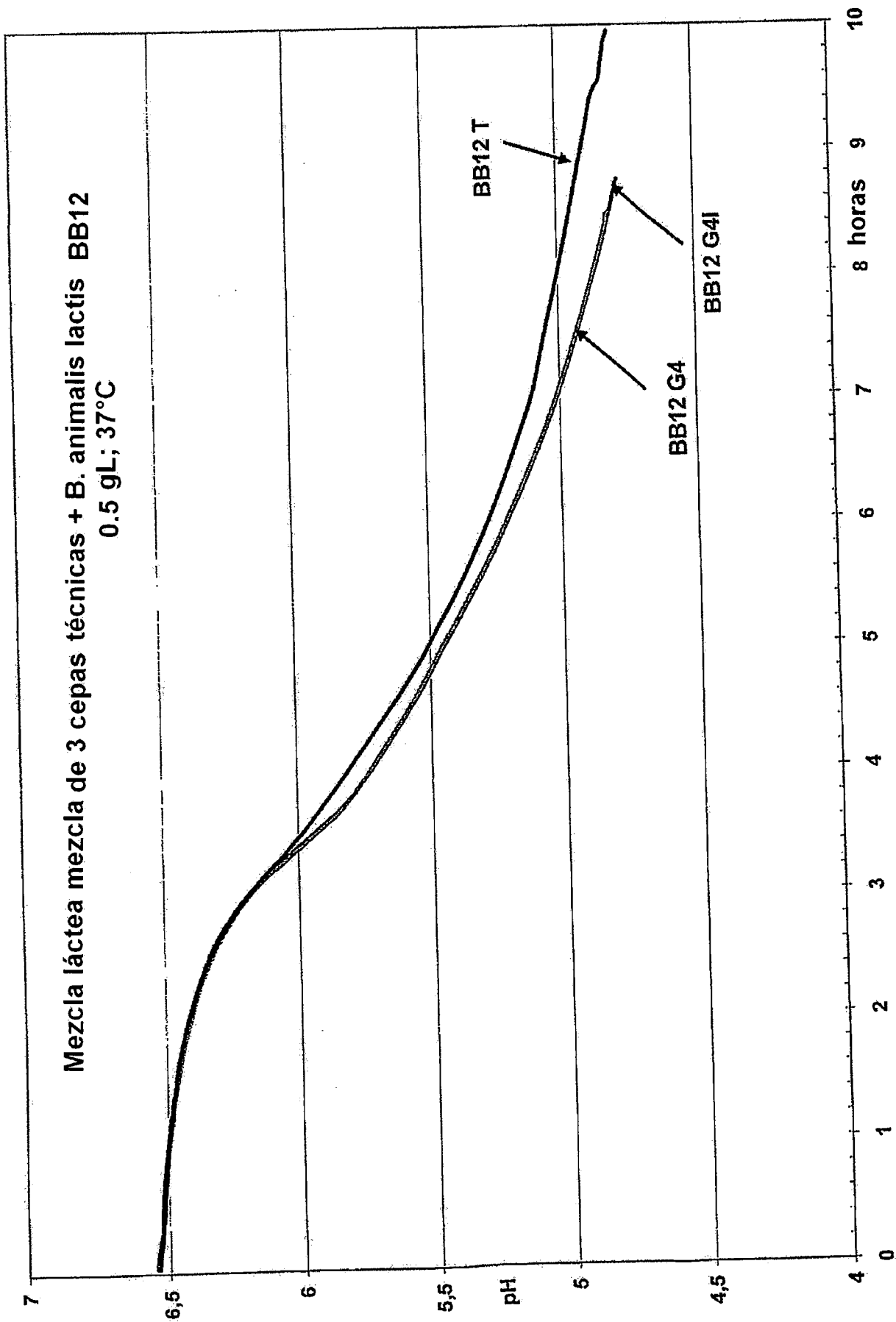


Figura 6

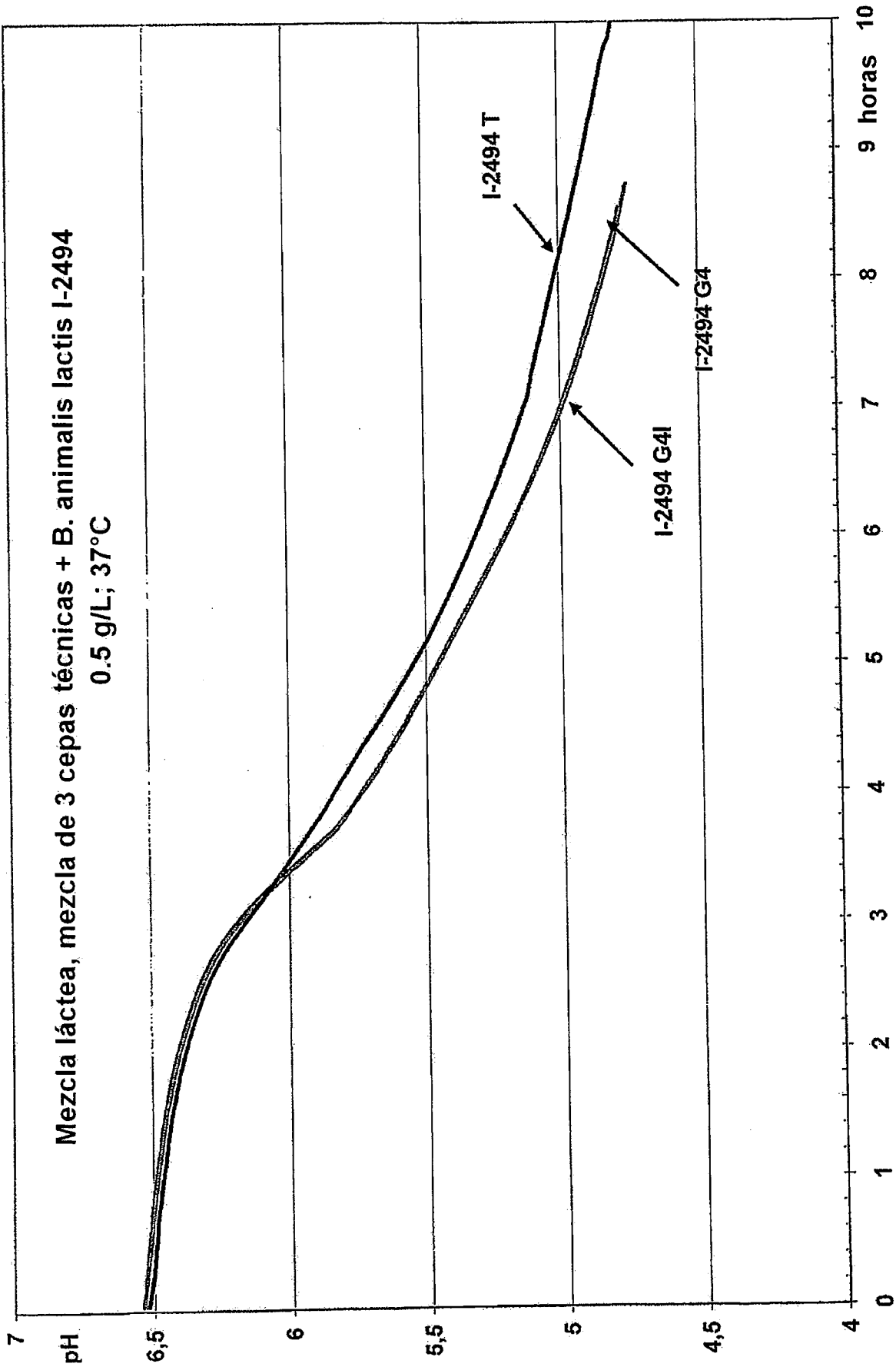


Figura 7

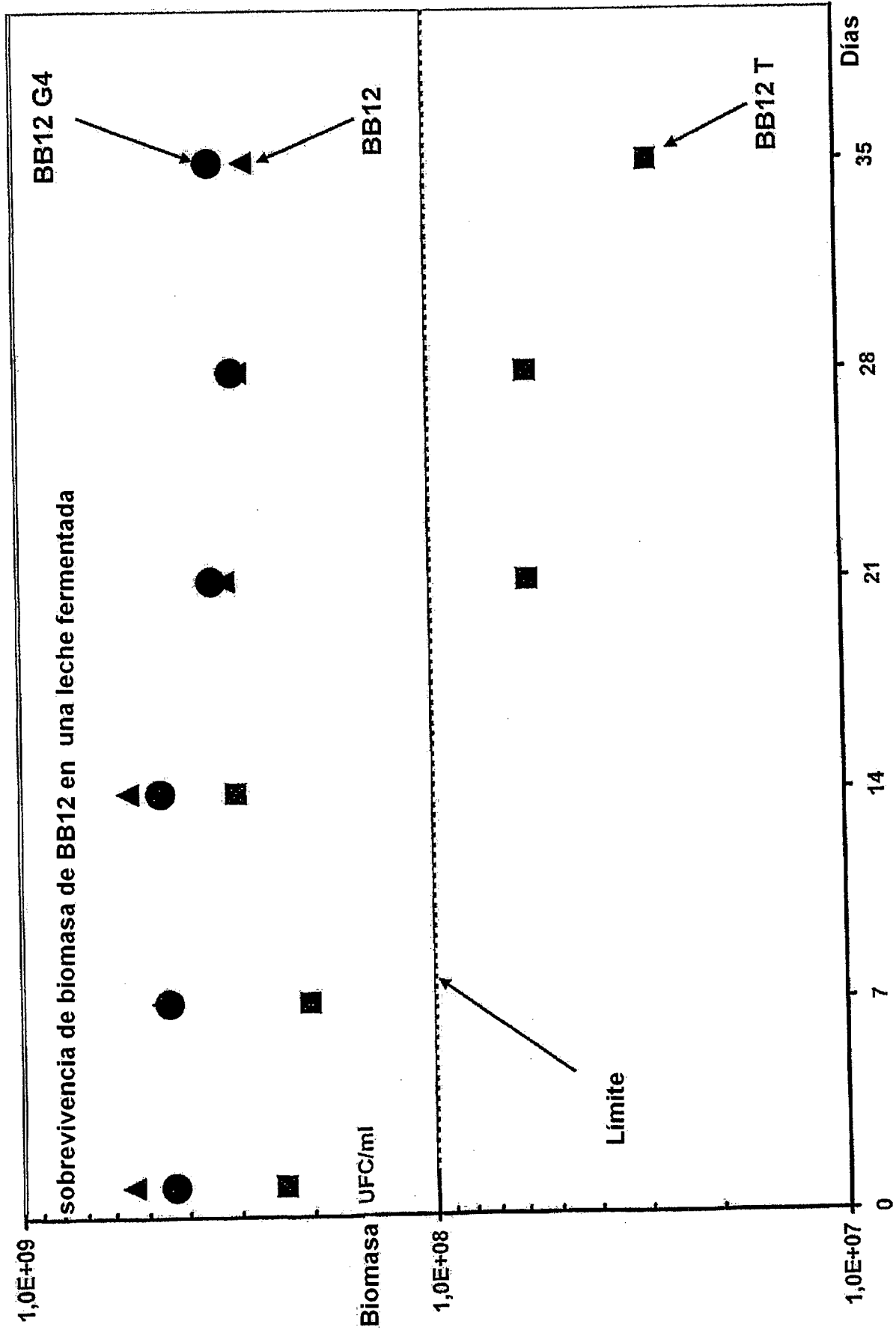


Figura 8

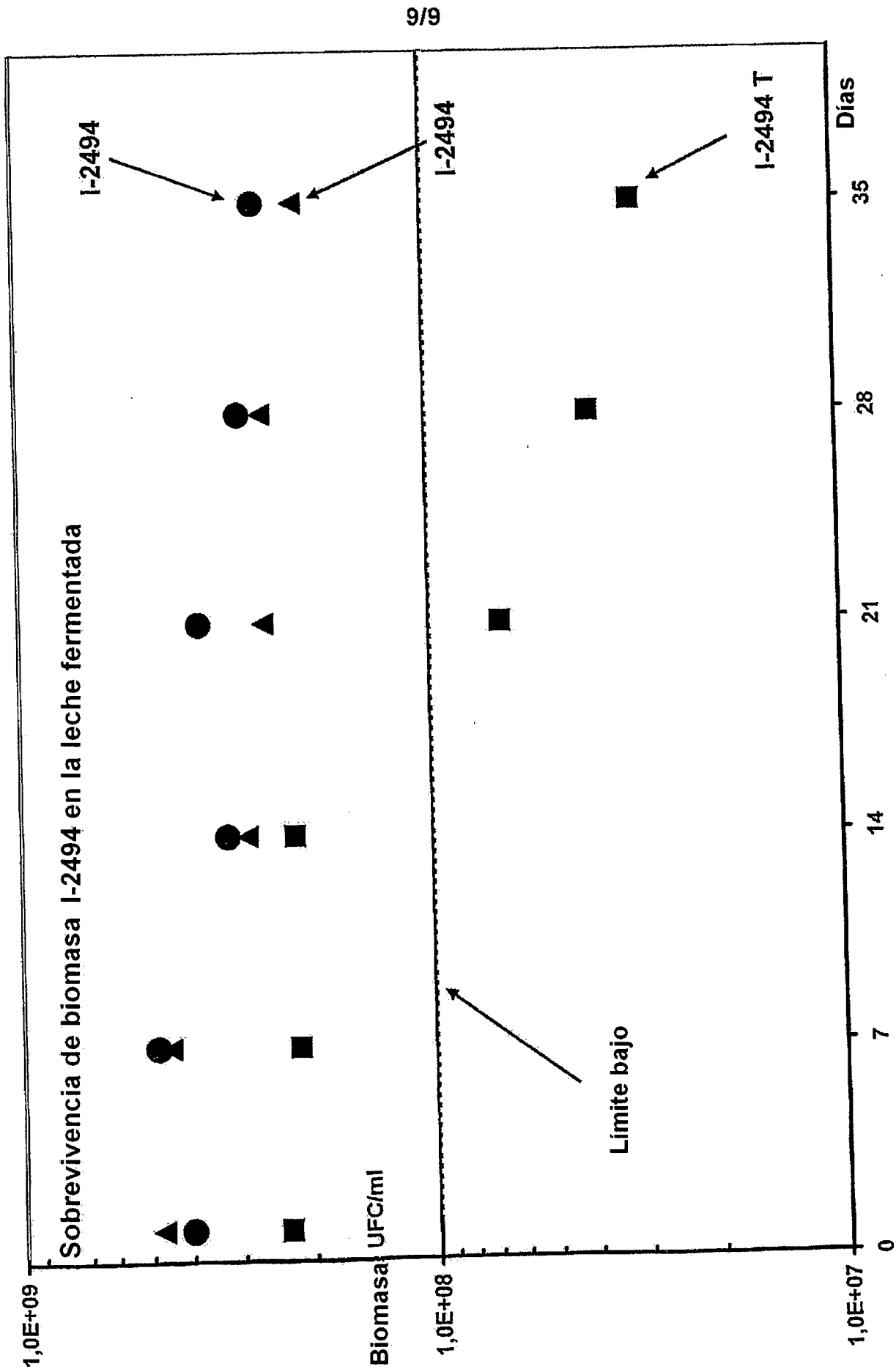


Figura 9

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

NOTIFICATION RELATIVE À LA
DISPONIBILITÉ DE LA PUBLICATION
DE LA DEMANDE INTERNATIONALE

Destinataire :

PARIS, Fabienne
Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A.
3, rue Auber
F-75009 Paris
FRANCE

Date d'expédition (jour/mois/année)
17 janvier 2008 (17.01.2008)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
B6515A - FP

NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale n°
PCT/FR2007/000916

Date du dépôt international (jour/mois/année)
01 juin 2007 (01.06.2007)

Date de priorité (jour/mois/année)
13 juillet 2006 (13.07.2006)

Déposant

COMPAGNIE GERVAIS DANONE etc

Il est notifié au déposant que le Bureau international

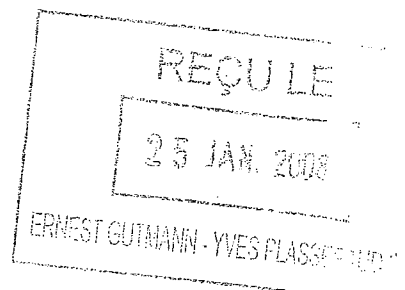
☒ a publié la demande internationale indiquée ci-dessus le 17 janvier 2008 (17.01.2008) sous le n° WO 2008/006949

☐ a publié à nouveau la demande internationale indiquée ci-dessus le sous le n° WO

Pour toute explication concernant cette nouvelle publication de la demande internationale, se reporter aux codes INID (15), (48) ou (88) (selon le cas) indiqués sur la page de couverture de la demande internationale publiée.

Une copie de la demande internationale peut être visualisée et téléchargée sur le site Internet de l'OMPI à l'adresse suivante : <http://www.wipo.int/pctdb> (sous la rubrique "Interrogation", entrer le numéro (PCT) de la demande ou le numéro de publication (WO)).

Le déposant peut également obtenir auprès du Bureau International une copie papier de la demande internationale publiée en écrivant à l'adresse électronique PatentScope@wipo.int, à l'adresse postale ou au numéro de télécopieur ci-dessous.



Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

Fonctionnaire autorisé

Beate Giffo-Schmitt

n° de télécopieur +41 22 338 82 70

courriel : pt03.pct@wipo.int

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

PREMIER AVIS INFORMANT LE DÉPOSANT
DE LA COMMUNICATION DE LA DEMANDE
INTERNATIONALE (AUX OFFICES DÉSIGNÉS
QUI N'APPLIQUENT PAS LE DÉLAI DE
30 MOIS SELON L'ARTICLE 22.1))

(règle 47.1.c) du PCT)

Destinataire :

PARIS, Fabienne
Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A.
3, rue Auber
F-75009 Paris
FRANCE

REÇU LE

4 - MARS 2008

ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD SAS

Date d'expédition (jour/mois/année)
14 février 2008 (14.02.2008)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
B6515A - FP

Demande internationale n°
PCT/FR2007/000916

Date du dépôt international (jour/mois/année)
01 juin 2007 (01.06.2007)

Date de priorité (jour/mois/année)
13 juillet 2006 (13.07.2006)

Déposant

COMPAGNIE GERVAIS DANONE etc

AVIS IMPORTANT

- ATTENTION** : Pour tout office désigné auquel le délai selon l'article 22.1) tel qu'il est en vigueur depuis le 1^{er} avril 2002 (30 mois à compter de la date de priorité) **s'applique**, se reporter au formulaire PCT/IB/308(Deuxième avis supplémentaire) (qui sera émis à bref délai après l'expiration du délai de 28 mois à compter de la date de priorité).
- Il est notifié par la présente que l'office ou les offices désignés suivants – auxquels le délai selon l'article 22.1) tel qu'il est en vigueur depuis le 1^{er} avril 2002 **ne s'applique pas** – ont demandé que la communication de la demande internationale, prévue à l'article 20, soit effectuée conformément à la règle 93bis.1. Le Bureau international a adressé cette communication à la date indiquée ci-dessous :

Aucun

Conformément à la règle 47.1.c-bis)i), ces offices accepteront le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien été effectuée à la date d'expédition indiquée ci-dessus et il ne sera pas exigé du déposant qu'il fournisse une copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

- Les offices désignés suivants, auxquels le délai selon l'article 22.1) tel qu'il est en vigueur depuis le 1^{er} avril 2002 **ne s'applique pas**, n'ont pas demandé, à la date d'expédition du présent avis, que la communication de la demande internationale soit effectuée conformément à la règle 93bis.1 :

CH, LU, TZ, UG

Conformément à la règle 47.1.c-bis)ii), ces offices accepteront le présent avis comme preuve déterminante du fait que l'État contractant pour lequel cet office agit en tant qu'office désigné n'exige pas du déposant qu'il fournisse en vertu de l'article 22 une copie de la demande internationale.

4. DÉLAIS pour l'ouverture de la phase nationale

Pour le ou les offices désignés mentionnés ci-dessus et à moins qu'une demande d'examen préliminaire international ait été présentée avant l'expiration du délai de **19 mois** à compter de la date de priorité (voir l'article 39.1)), le délai applicable pour l'ouverture de la phase nationale sera, sous réserve de ce qui est dit au paragraphe suivant, de **20 MOIS** à compter de la date de priorité.

En pratique, des délais autres que celui de 20 mois continueront de s'appliquer, pour des durées diverses, en ce qui concerne certains offices désignés mentionnés ci-dessus. Pour obtenir les mises à jour régulières relatives aux délais applicables (20 ou 21 mois, ou autre délai), office par office, on se reportera à la *Gazette du PCT*, au bulletin *PCT Newsletter* ainsi qu'aux chapitres nationaux pertinents dans le volume II du *Guide du déposant du PCT*, accessibles sur le site Internet de l'OMPI à l'adresse suivante : <http://www.wipo.int/pct/fr/index.html>.

Le déposant est seul responsable du respect de tous les délais visés ci-dessus.

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

Fonctionnaire autorisé

Beate Giffo-Schmitt

n° de télécopieur +41 22 338 82 70

courriel : pt03.pct@wipo.int

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

DEUXIÈME AVIS SUPPLÉMENTAIRE INFORMANT
LE DÉPOSANT DE LA COMMUNICATION DE LA
DEMANDE INTERNATIONALE (AUX OFFICES
DÉSIGNÉS QUI APPLIQUENT LE DÉLAI DE
30 MOIS SELON L'ARTICLE 22.1))

(règle 47.1.c) du PCT)

Destinataire :

PARIS, Fabienne
Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A.
3, rue Auber
F-75009 Paris
FRANCE

REÇU

25 NOV. 2008

AVIS IMPORTANT

Date d'expédition (jour/mois/année)
13 novembre 2008 (13.11.2008)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire
B6515A - FP

Demande internationale n°
PCT/FR2007/000916

Date du dépôt international (jour/mois/année)
01 juin 2007 (01.06.2007)

Date de priorité (jour/mois/année)
13 juillet 2006 (13.07.2006)

Déposant

COMPAGNIE GERVAIS DANONE etc

- ATTENTION** : Pour tout office désigné auquel le délai selon l'article 22.1) tel qu'il est en vigueur depuis le 1er avril 2002 (30 mois à compter de la date de priorité) **ne s'applique pas**, se reporter au formulaire PCT/IB/308(Premier avis) émis antérieurement.
- Il est notifié par la présente que l'office ou les offices désignés suivants – auxquels le délai selon l'article 22.1) tel qu'il est en vigueur depuis le 1er avril 2002 **s'applique** – ont demandé que la communication de la demande internationale, prévue à l'article 20, soit effectuée conformément à la règle 93bis.1. Le Bureau international a adressé cette communication à la date indiquée ci-dessous :
17 janvier 2008 (17.01.2008)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MY, MZ, NA, NG, PG, RU, SY, TM, US

Conformément à la règle 47.1.c-bis)i), ces offices accepteront le présent avis comme preuve déterminante du fait que la communication de la demande internationale a bien été effectuée à la date d'expédition indiquée ci-dessus et il ne sera pas exigé du déposant qu'il fournisse une copie de la demande internationale à l'office ou aux offices désignés.

- Les offices désignés suivants, auxquels le délai selon l'article 22.1) tel qu'il est en vigueur depuis le 1er avril 2002 **s'applique**, n'ont pas demandé, à la date d'expédition du présent avis, que la communication de la demande internationale soit effectuée conformément à la règle 93bis.1 :

AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BZ, CA, CH, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KM, KN, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LY, MA, ME, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, RS, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Conformément à la règle 47.1.c-bis)ii), ces offices accepteront le présent avis comme preuve déterminante du fait que l'État contractant pour lequel cet office agit en tant qu'office désigné n'exige pas du déposant qu'il fournisse en vertu de l'article 22 une copie de la demande internationale.

4. DÉLAIS pour l'ouverture de la phase nationale

Pour le ou les offices désignés ou élus mentionnés ci-dessus, le délai applicable pour l'ouverture de la phase nationale sera, sous réserve de ce qui est dit au paragraphe suivant, de 30 MOIS à compter de la date de priorité.

En pratique, des délais autres que celui de 30 mois continueront de s'appliquer, pour des durées diverses, en ce qui concerne certains offices désignés ou élus mentionnés ci-dessus. Pour obtenir les mises à jour régulières relatives aux délais applicables (30 ou 31 mois, ou autre délai), office par office, on se reportera à la Gazette du PCT, au bulletin PCT Newsletter ainsi qu'aux chapitres nationaux pertinents dans le volume II du Guide du déposant du PCT, accessibles sur le site Internet de l'OMPI à l'adresse suivante : <http://www.wipo.int/pct/fr/index.html>.

Le déposant est seul responsable du respect de tous les délais visés ci-dessus.

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

Fonctionnaire autorisé

Beate Giffo-Schmitt

n° de télécopieur +41 22 338 82 70

courriel : pt03.pct@wipo.int

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

NOTIFICATION RELATIVE
À LA PRÉSENTATION OU À LA TRANSMISSION
DU DOCUMENT DE PRIORITÉ

(instruction administrative 411 du PCT)

Destinataire :
PARIS, Fabienne Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A. 3, rue Auber F-75009 Paris FRANCE

REÇU LE
1 - OCT. 2007
ERNEST GUTMANN - YVES PLESSERAUD SAS

Date d'expédition (jour/mois/année) 17 septembre 2007 (17.09.2007)	
Référence du dossier du déposant ou du mandataire B6515A - FP	NOTIFICATION IMPORTANTE
Demande internationale n° PCT/FR2007/000916	Date du dépôt international (jour/mois/année) 01 juin 2007 (01.06.2007)
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	Date de priorité (jour/mois/année) 13 juillet 2006 (13.07.2006)
Déposant COMPAGNIE GERVAIS DANONE etc	

- Par le présent formulaire, qui remplace toute notification antérieure relative à la présentation ou à la transmission de documents de priorité, il est notifié au déposant la date de réception par le Bureau international du ou des documents de priorité concernant toute demande antérieure dont la priorité est revendiquée. Sauf indication contraire consistant en les lettres "NR", figurant dans la colonne de droite, ou un astérisque figurant à côté d'une date de réception, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
- (Le cas échéant) Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité qui, à la date d'expédition du présent formulaire, n'a pas encore été reçu par le Bureau international selon la règle 17.1.a) ou b). Lorsque, selon la règle 17.1.a), le document de priorité doit être présenté par le déposant à l'office récepteur ou au Bureau international, mais que le déposant n'a pas présenté le document de priorité dans le délai prescrit par cette règle, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) selon laquelle aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité considérée avant d'avoir donné au déposant la possibilité, à l'ouverture de la phase nationale, de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
- (Le cas échéant) Un astérisque (*) figurant à côté de la date de réception, dans la colonne de droite, signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b) (le document de priorité a été reçu après le délai prescrit par la règle 17.1.a) ou la demande d'établissement et de transmission du document de priorité a été soumise à l'office récepteur après le délai prescrit par la règle 17.1.b)). Même si le document de priorité n'a pas été remis conformément à la règle 17.1.a) ou b), le Bureau international transmettra une copie du document aux offices désignés, pour leur appréciation. Dans le cas où une telle copie n'est pas acceptée par un office désigné comme document de priorité, la règle 17.1.c) énonce que aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité considérée avant d'avoir donné au déposant la possibilité, à l'ouverture de la phase nationale, de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

Date de priorité	Demande de priorité n°	Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT	Date de réception du document de priorité
13 juillet 2006 (13.07.2006)	0606421	FR	30 août 2007 (30.08.2007)

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé Beate Giffo-Schmitt
n° de télécopieur +41 22 338 82 70	e-mail
Formulaire PCT/IB/304 (octobre 2005)	n° de téléphone +41 22 338 74 03

I/DDZKWH1T0

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

PCT

NOTIFICATION DE LA RÉCEPTION DE
L'EXEMPLAIRE ORIGINAL

(règle 24.2.a) du PCT)

Destinataire :

PARIS, Fabienne
Ernest Gutmann - Yves Plasseraud S.A.
3, rue Auber
F-75009 Paris
FRANCE

REÇU LE

30 AOÛT 2007

ERNEST GUTMANN - YVES PLESSERAUD S.A.

NOTIFICATION IMPORTANTE

Date d'expédition (jour/mois/année)

21 août 2007 (21.08.2007)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

B6515A - FP

Demande internationale n°

PCT/FR2007/000916

Il est notifié au déposant que le Bureau international a reçu l'exemplaire original de la demande internationale précisée ci-après.

Nom(s) du ou des déposants et de l'État ou des États pour lesquels ils sont déposants :

COMPAGNIE GERVAIS DANONE (pour tous les pays désignés excepté US)
MARCHAL, Laurent et al (pour US)

Date du dépôt international :

01 juin 2007 (01.06.2007)

Date(s) de priorité revendiquée(s) :

13 juillet 2006 (13.07.2006)

Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :

09 août 2007 (09.08.2007)

Liste des offices désignés :

AP: BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW

EA: AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

EP: AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR

OA: BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

ational: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

ATTENTION: Le déposant doit soigneusement vérifier les indications figurant dans la présente notification. En cas de divergence entre ces indications et celles que contient la demande internationale, il doit aviser immédiatement le Bureau international. En outre, l'attention du déposant est appelée sur les renseignements suivants donnés dans l'annexe :

- délais dans lesquels doit être abordée la phase nationale - voir renseignements importants mis à jour (à compter d'avril 2002)
- exigences relatives aux documents de priorité (le cas échéant)

Une copie de la présente notification est envoyée à l'office récepteur et à l'administration chargée de la recherche internationale.

Bureau international de l'OMPI
34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse

Fonctionnaire autorisé

Craker Alexander

e-mail pt03.pct@wipo.int

n° de téléphone +41 22 338 74 03

n° de télécopieur +41 22 338 87 20

Formulaire PCT/IB/301 (octobre 2005)

1/DCZ9M94H0

RENSEIGNEMENTS CONCERNANT L'OUVERTURE DE LA PHASE NATIONALE

Il est rappelé au déposant qu'il doit aborder la "phase nationale" auprès de chacun des offices désignés indiqués sur la page de couverture de la présente notification en payant les taxes nationales et en remettant les traductions, comme prévu par les articles 22 et 39 et par les législations nationales applicables. De plus, le déposant devra dans certains cas satisfaire à d'autres exigences particulières applicables dans certains offices. Il lui appartient de veiller à remplir en temps voulu les conditions requises pour l'ouverture de la phase nationale. La majorité des offices n'envoient pas de rappel à l'approche de la date limite pour aborder la phase nationale.

Le délai applicable pour l'ouverture de la phase nationale sera, sous réserve de ce qui est dit au paragraphe suivant, de 30 MOIS à compter de la date de priorité, non seulement en ce qui concerne tout office élu lorsqu'une demande d'examen préliminaire international aura été présentée avant l'expiration du délai de 19 mois à compter de la date de priorité (voir l'article 39.1)), mais également en ce qui concerne tout office désigné, en l'absence de présentation d'une telle demande d'examen, lorsque l'article 22.1) tel que modifié avec effet au 1^{er} avril 2002 sera applicable audit office désigné. Pour plus de renseignements, voir la *Gazette du PCT* n° 44/2001 du 1^{er} novembre 2001, pages 19927, 19933 and 19935, ainsi que le bulletin *PCT Newsletter*, numéros d'octobre et de novembre 2001 et de février 2002.

En pratique, des délais autres que celui de 30 mois vont continuer de s'appliquer, pour des durées diverses, en ce qui concerne certains offices désignés ou élus. Pour obtenir les mises à jour régulières relatives aux délais applicables (20, 21, 30 ou 31 mois ou autre délai), office par office, on se reportera à la *Gazette du PCT* (la partie "section IV" publiée chaque semaine), au bulletin *PCT Newsletter* (publié chaque mois) ainsi qu'aux chapitres nationaux pertinents dans le volume II du *Guide du déposant du PCT* (dont la version papier est mise à jour normalement deux fois par an et la version Internet normalement chaque semaine). Enfin, un tableau cumulatif de tous les délais applicables pour l'ouverture de la phase nationale est accessible sur le site Internet de l'OMPI, par l'intermédiaire de liens à partir de diverses pages du site, y compris celles de la *Gazette*, de la *Newsletter* et du *Guide*, à l'adresse suivante: <http://www.wipo.int/pct/fr/index.html>.

Des informations relatives aux exigences concernant la présentation d'une demande d'examen préliminaire international figurent dans le *Guide du déposant du PCT*, volume I/A, chapitre IX. Seul un déposant qui est ressortissant d'un État contractant du PCT lié par le chapitre II ou qui y a son domicile peut présenter une demande d'examen préliminaire international (actuellement, tous les États contractants du PCT sont liés par le chapitre II).

EXIGENCES RELATIVES AUX DOCUMENTS DE PRIORITÉ

Pour les déposants qui n'ont pas encore satisfait aux exigences relatives aux documents de priorité, il est rappelé ce qui suit.

Lorsque la priorité d'une demande nationale, régionale ou internationale antérieure est revendiquée, le déposant doit présenter une copie de cette demande antérieure, certifiée conforme par l'administration auprès de laquelle elle a été déposée ("document de priorité"), à l'office récepteur (qui la transmettra au Bureau international) ou directement au Bureau international, avant l'expiration d'un délai de 16 mois à compter de la date de priorité, étant entendu que tout document de priorité peut être présenté au Bureau international avant la date de publication internationale de la demande internationale, auquel cas ce document sera réputé avoir été reçu par le Bureau international le dernier jour du délai de 16 mois (règle 17.1.a)).

Lorsque le document de priorité est délivré par l'office récepteur, le déposant peut, au lieu de présenter ce document, demander à l'office récepteur de le préparer et de le transmettre au Bureau international. La requête à cet effet doit être formulée avant l'expiration du délai de 16 mois et peut être soumise au paiement d'une taxe (règle 17.1.b)).

Si le document de priorité en question n'est pas fourni au Bureau international et si la demande adressée à l'office récepteur de préparer et de transmettre le document de priorité n'a pas été faite (et la taxe correspondante acquittée, le cas échéant) avant l'expiration du délai applicable mentionné aux paragraphes précédents, tout État désigné peut ne pas tenir compte de la revendication de priorité; toutefois, aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité, à l'ouverture de la phase nationale, de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce (règle 17.1.c)).

Lorsque plusieurs priorités sont revendiquées, la date de priorité à prendre en considération aux fins du calcul du délai de 16 mois (et de tous les autres délais du PCT) est la date du dépôt de la demande la plus ancienne dont la priorité est revendiquée (article 2.xi)b)).

TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS

Expéditeur : L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
LA RECHERCHE INTERNATIONALE

PCT

Destinataire

ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD SAS
A l'att. de Paris, Fabienne
3 rue Auber
75009 Paris
FRANCE

REÇU LE

27 SEP. 2007

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU
RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE
ET DE L'OPINION ÉCRITE DE L'ADMINISTRATION
CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE
OU DE LA DÉCLARATION
(règle 44.1 du PCT)

Date d'expédition

(jour/mois/année)

26/09/2007

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

B6515A - FP

POUR SUITE À DONNER

voir les paragraphes 1 et 4 ci-après

Demande internationale n°

PCT/FR2007/000916

Date du dépôt international

(jour/mois/année)

01/06/2007

Déposant

COMPAGNIE GERVAIS DANONE

1. ☒ Il est notifié au déposant que le rapport de recherche internationale a été établi et lui est transmis ci-joint.

Dépôt de modifications et d'une déclaration selon l'article 19 :

Le déposant peut, s'il le souhaite, modifier les revendications de la demande internationale (voir la règle 46):

Quand? Le délai dans lequel les modifications doivent être déposées est de deux mois à compter de la date de transmission du rapport de recherche internationale.

Où? Directement auprès du Bureau international de l'OMPI, 34, chemin des Colombettes
1211 Genève 20, Suisse, n° de télécopieur: +41 22 338 82 70

Pour des instructions plus détaillées, voir les notes sur la feuille d'accompagnement.

2. ☐ Il est notifié au déposant qu'il ne sera pas établi de rapport de recherche internationale et que la déclaration à cet effet, prévue à l'article 17.2a), ainsi que l'opinion écrite de l'administration chargée de la recherche internationale sont transmises par le présent formulaire.

3. ☐ **En ce qui concerne la réserve** pouvant être formulée, conformément à la règle 40.2, à l'égard du paiement d'une ou de plusieurs taxes additionnelles, il est notifié au déposant que
- ☐ la réserve ainsi que la décision y relative ont été transmises au Bureau international en même temps que la requête du déposant tendant à ce que le texte de la réserve et celui de la décision en question soient notifiés aux offices désignés.
 - ☐ la réserve n'a encore fait l'objet d'aucune décision; dès qu'une décision aura été prise, le déposant en sera avisé.

4. Rappels

Peu après l'expiration d'un délai de **18 mois** à compter de la date de priorité, la demande internationale sera publiée par le Bureau international. Si le déposant souhaite éviter ou différer la publication, il doit faire parvenir au Bureau international une déclaration de retrait de la demande internationale, ou de la revendication de priorité, conformément aux règles 90bis.1 et 90bis.3, respectivement, avant l'achèvement de la préparation technique de la publication internationale.

Le déposant a la possibilité de présenter des observations de manière informelle au Bureau international sur l'opinion écrite de l'administration chargée de la recherche internationale. Le Bureau international enverra aux offices désignés une copie de ces observations, à moins qu'un rapport d'examen préliminaire international ait été établi ou doive être établi. Ces observations seraient également mises à la disposition des tiers mais pas avant l'expiration d'un délai de 30 mois à compter de la date de priorité.

Dans un délai de **19 mois** à compter de la date de priorité, mais seulement en ce qui concerne certains offices désignés, le déposant doit présenter une demande d'examen préliminaire international s'il souhaite que l'ouverture de la phase nationale soit **reportée à 30 mois** à compter de la date de priorité (ou même au-delà dans certains offices); si tel n'est pas le cas, le déposant doit accomplir, dans un délai de **20 mois** à compter de la date de priorité, les démarches prescrites pour l'ouverture de la phase nationale auprès de ces offices désignés.

En ce qui concerne d'autres offices désignés, le délai de **30 mois** (ou plus) s'appliquera même si aucune demande d'examen préliminaire international n'est présentée dans le délai de 19 mois.

Voir l'annexe du formulaire PCT/IB/301 et, pour plus de précisions quant aux délais applicables, office par office, voir les chapitres nationaux dans le volume II du *Guide du déposant du PCT* et le site internet de l'OMPI.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la
recherche internationale



Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Eleonora Longo

NOTES RELATIVES AU FORMULAIRE PCT/ISA/220

Les présentes notes sont destinées à donner les instructions essentielles concernant le dépôt de modifications selon l'article 19. Les notes sont fondées sur les exigences du Traité de coopération en matière de brevets (PCT), du règlement d'exécution et des instructions administratives du PCT. En cas de divergence entre les présentes notes et ces exigences, ce sont ces dernières qui priment. Pour de plus amples renseignements, on peut aussi consulter le *Guide du déposant du PCT*, qui est une publication de l'OMPI.

Dans les présentes notes, les termes "article", "règle" et "instruction" renvoient aux dispositions du traité, de son règlement d'exécution et des instructions administratives du PCT, respectivement.

INSTRUCTIONS CONCERNANT LES MODIFICATIONS SELON L'ARTICLE 19

Après réception du rapport de recherche internationale et de l'opinion écrite de l'administration chargée de la recherche internationale, le déposant a la possibilité de modifier une fois les revendications de la demande internationale. On notera cependant que, comme toutes les parties de la demande internationale (revendications, description et dessins) peuvent être modifiées au cours de la procédure d'examen préliminaire international, il n'est généralement pas nécessaire de déposer de modifications des revendications selon l'article 19 sauf, par exemple, au cas où le déposant souhaite que ces dernières soient publiées aux fins d'une protection provisoire ou a une autre raison de modifier les revendications avant la publication internationale. En outre, il convient de rappeler que l'obtention d'une protection provisoire n'est possible que dans certains États (voir les annexes B1 et B2 du volume I du *Guide du déposant du PCT*).

L'attention du déposant est attirée sur le fait que des modifications des revendications selon l'article 19 ne sont pas permises lorsque l'administration chargée de la recherche internationale a déclaré, conformément à l'article 17.2), qu'aucun rapport de recherche internationale ne sera établi (voir le paragraphe 296 du volume I du *Guide du déposant du PCT*).

Quelles parties de la demande internationale peuvent être modifiées?

Selon l'article 19, les revendications exclusivement.

Durant la phase internationale, les revendications peuvent aussi être modifiées (ou modifiées à nouveau) selon l'article 34 auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international. La description et les dessins ne peuvent être modifiées que selon l'article 34 auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international.

Lors de l'ouverture de la phase nationale, toutes les parties de la demande internationale peuvent être modifiées selon l'article 28 ou, le cas échéant, selon l'article 41.

Quand?

Dans un délai de deux mois à compter de la date de transmission du rapport de recherche internationale ou de 16 mois à compter de la date de priorité, selon l'échéance la plus tardive. Il convient cependant de noter que les modifications seront réputées avoir été reçues en temps voulu si elles parviennent au Bureau international après l'expiration du délai applicable mais avant l'achèvement de la préparation technique de la publication internationale (règle 46.1).

Où ne pas déposer les modifications?

Les modifications ne peuvent être déposées qu'auprès du Bureau international; elles ne peuvent être déposées ni auprès de l'office récepteur ni auprès de l'administration chargée de la recherche internationale (règle 46.2).

Lorsqu'une demande d'examen préliminaire international a été/est déposée, voir plus loin.

Comment?

Soit en supprimant entièrement une ou plusieurs revendications, soit en ajoutant une ou plusieurs revendications nouvelles ou encore en modifiant le texte d'une ou de plusieurs des revendications telles que déposées.

Une feuille de remplacement doit être remise pour chaque feuille des revendications qui, en raison d'une ou de plusieurs modifications, diffère de la feuille initialement déposée.

Toutes les revendications figurant sur une feuille de remplacement doivent être numérotées en chiffres arabes. Si une revendication est supprimée, il n'est pas obligatoire de renuméroter les autres revendications. Chaque fois que des revendications sont renumérotées, elles doivent l'être de façon continue (instruction 205.b)).

Les modifications doivent être effectuées dans la langue dans laquelle la demande internationale est publiée.

Quels documents doivent/peuvent accompagner les modifications?

Lettre (instruction 205.b)):

Les modifications doivent être accompagnées d'une lettre.

La lettre ne sera pas publiée avec la demande internationale et les revendications modifiées. Elle ne doit pas être confondue avec la "déclaration selon l'article 19.1)" (voir plus loin sous "Déclaration selon l'article 19.1)").

La lettre doit être rédigée en anglais ou en français, au choix du déposant. Cependant, si la langue de la demande internationale est l'anglais, la lettre doit être rédigée en anglais; si la langue de la demande internationale est le français, la lettre doit être rédigée en français.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2007/000916

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. A23C9/13 A23C9/123

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
A23C

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, WPI Data, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 855 182 A1 (GERVAIS DANONE SA [FR]) 26 novembre 2004 (2004-11-26) page 11, ligne 21 - ligne 22; revendications; exemples	1-23
A	EP 0 486 738 A1 (YAKULT HONSHA KK [JP]) 27 mai 1992 (1992-05-27) page 4, ligne 48 - page 5, ligne 8; revendications; exemples	1-23
A	GB 1 271 674 A (NISSHIN FLOUR MILLING CO [JP]) 26 avril 1972 (1972-04-26) exemple 4	1-23

-/--

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

18 septembre 2007

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26/09/2007

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Smeets, Dieter

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	DAVE R I ET AL: "INGREDIENT SUPPLEMENTATION EFFECTS ON VIABILITY OF PROBIOTIC BACTERIA IN YOGHURT" JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, AMERICAN DAIRY SCIENCE ASSOCIATION, SAVOY, IL, US, vol. 81, no. 11, novembre 1998 (1998-11), pages 2804-2816, XP000787922 ISSN: 0022-0302 figure 1; tableau 4 -----	1-23
A	DECHTER T H ET AL: "SURVIVABILITY AND BETA-GALACTOSIDASE ACTIVITY OF BIFIDOBACTERIA STORED AT LOW TEMPERATURES" FOOD BIOTECHNOLOGY, DEKKER, NEW YORK, NY, US, vol. 12, no. 1/2, 1998, pages 73-89, XP008039285 ISSN: 0890-5436 le document en entier -----	1-23

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2007/000916

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2855182	A1	26-11-2004	AT 347811 T	15-01-2007
			BR PI0410444 A	06-06-2006
			DK 1624761 T3	10-04-2007
			EP 1624761 A1	15-02-2006
			ES 2278329 T3	01-08-2007
			WO 2004103082 A1	02-12-2004
			MX PA05012399 A	06-07-2006
EP 0486738	A1	27-05-1992	AU 6695090 A	18-06-1992
			CA 2030630 A1	23-05-1992
			JP 2308754 A	21-12-1990
			US 5230912 A	27-07-1993
GB 1271674	A	26-04-1972	DE 1934652 A1	22-01-1970
			FR 2014544 A5	17-04-1970

TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS

Expéditeur : L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE
LA RECHERCHE INTERNATIONALE

Destinataire :

voir le formulaire PCT/ISA/220

PCT

OPINION ÉCRITE DE L'ADMINISTRATION
CHARGÉE DE LA RECHERCHE
INTERNATIONALE

(règle 43bis.1 du PCT)

Date d'expédition

(jour/mois/année)

PCT/ISA/210 (deuxième feuille)

voir le formulaire

Référence du dossier du déposant ou du mandataire

voir le formulaire PCT/ISA/220

POUR SUITE À DONNER

Voir le point 2 ci-dessous

Demande internationale No.

PCT/FR2007/000916

Date du dépôt international (jour/mois/année)

01.06.2007

Date de priorité (jour/mois/année)

13.07.2006

Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB

INV. A23C9/13 A23C9/123

Déposant

COMPAGNIE GERVAIS DANONE

1. La présente opinion contient des indications et les pages correspondantes relatives aux points suivants :

- ☒ Cadre n° I Base de l'opinion
- ☐ Cadre n° II Priorité
- ☐ Cadre n° III Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- ☐ Cadre n° IV Absence d'unité de l'invention
- ☒ Cadre n° V Déclaration motivée selon la règle 43bis.1(a)(i) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- ☐ Cadre n° VI Certains documents cités
- ☐ Cadre n° VII Certaines irrégularités relevées dans la demande internationale
- ☐ Cadre n° VIII Certaines observations relatives à la demande internationale

2. SUITE À DONNER

Si une demande d'examen préliminaire internationale est présentée, la présente opinion sera considérée comme une opinion écrite de l'administration chargée de l'examen préliminaire international, sauf dans le cas où le déposant a choisi une administration différente de la présente administration aux fins de l'examen préliminaire international et que l'administration considérée a notifié au Bureau international, selon la règle 66.1bis.b), qu'elle n'entend pas considérer comme les siennes les opinions écrites de la présente administration chargée de la recherche internationale.

Si, comme cela est indiqué ci-dessus, la présente opinion écrite est considérée comme l'opinion écrite de l'administration chargée de l'examen préliminaire international, le déposant est invité à soumettre à l'administration chargée de l'examen préliminaire international une réponse écrite, avec le cas échéant des modifications, avant l'expiration d'un délai de 3 mois à compter de la date d'envoi du formulaire PCT/ISA/220 ou avant l'expiration d'un délai de 22 mois à compter de la date de priorité, le délai expirant le dernier devant être appliqué.

Pour plus de détails sur les possibilités offertes au déposant, se référer au formulaire PCT/ISA/220.

3. Pour de plus amples détails, se référer aux notes relatives au formulaire PCT/ISA/220.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale



Office européen des brevets
D-80298 Munich
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date à laquelle la
présente opinion a été
établie

voir le formulaire
PCT/ISA/210

Fonctionnaire autorisé

Smeets, Dieter

N° de téléphone +49 89 2399-7492



OPINION ÉCRITE DE L'ADMINISTRATION
CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2007/000916

Cadre n°1 Base de l'opinion

1. En ce qui concerne la **langue**, la présente opinion a été établie sur la base
 - ☒ de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée
 - ☐ d'une traduction de la demande internationale dans la langue suivante, qui est la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (règles 12.3.a) et 23.1.b)).
2. En ce qui concerne **la ou les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale, le cas échéant, la recherche internationale a été effectuée sur la base des éléments suivants :
 - a. Nature de l'élément :
 - ☐ un listing de la ou des séquences
 - ☐ un ou des tableaux relatifs au listing de la ou des séquences
 - b. Type de support :
 - ☐ sur papier
 - ☐ sous forme électronique
 - c. Moment du dépôt ou de la remise :
 - ☐ contenu(s) dans la demande internationale telle que déposée
 - ☐ déposé(s) avec la demande internationale, sous forme électronique
 - ☐ remis ultérieurement à la présente administration aux fins de la recherche
3. ☐ De plus, lorsque plus d'une version ou d'une copie d'un listing des séquences ou d'un ou plusieurs tableaux y relatifs a été déposée, les déclarations requises selon lesquelles les informations fournies ultérieurement ou au titre de copies supplémentaires sont identiques à celles initialement fournies et ne vont pas au-delà de la divulgation faite dans la demande internationale telle que déposée initialement, selon le cas, ont été remises.
4. Commentaires complémentaires :

OPINION ÉCRITE DE L'ADMINISTRATION
CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°
PCT/FR2007/000916

Cadre n° V Déclaration motivée selon la règle 43bis.1(a)(i) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications	<u>1-23</u>
	Non : Revendications	
Activité inventive	Oui : Revendications	<u>1-23</u>
	Non : Revendications	
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications	<u>1-23</u>
	Non : Revendications	

2. Citations et explications

voir feuille séparée

Concernant le point V.

1 Il est fait référence aux documents suivants:

- D1 : FR 2 855 182 A1 (GERVAIS DANONE SA [FR]) 26 novembre 2004 (2004-11-26)
D2 : EP 0 486 738 A1 (YAKULT HONSHA KK [JP]) 27 mai 1992 (1992-05-27)
D3 : GB 1 271 674 A (NISSHIN FLOUR MILLING CO [JP]) 26 avril 1972 (1972-04-26)
D4 : DAVE R I ET AL: "INGREDIENT SUPPLEMENTATION EFFECTS ON VIABILITY OF PROBIOTIC BACTERIA IN YOGHURT" JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, AMERICAN DAIRY SCIENCE ASSOCIATION, SAVOY, IL, US, vol. 81, no. 11, novembre 1998 (1998-11), pages 2804-2816, XP000787922 ISSN: 0022-0302
D5 : DECHTER T H ET AL: "SURVIVABILITY AND BETA-GALACTOSIDASE ACTIVITY OF BIFIDOBACTERIA STORED AT LOW TEMPERATURES" FOOD BIOTECHNOLOGY, DEKKER, NEW YORK, NY, US, vol. 12, no. 1/2, 1998, pages 73-89, XP008039285 ISSN: 0890-5436

2 Nouveauté et activité inventive (Art. 33(1),(2) et (3) PCT)

- 2.1 Le document D1, qui est considéré comme étant l'état de la technique le plus proche de l'objet des revendications indépendantes 1, 20 et 21, décrit un procédé et inoculum sous forme de granule congelé comprenant une souche de *B. animalis spp. lactis* et une levure lysée.
- 2.2 Par conséquent, l'objet des revendications 1, 20 et 21 diffère de cet inoculum connu en ce qu'il comprend de la L-cystéine base qui est non liée à d'autres acides aminés en une quantité spécifique.
- 2.3 Le problème que la présente invention se propose de résoudre peut donc être considéré comme un inoculum alternatif adapté à l'ensemencement direct d'une souche de *B. animalis spp. lactis*.

- 2.4 La solution de ce problème proposée dans les revendications 1, 20 et 21 de la présente demande est considérée comme impliquant une activité inventive, et ce pour les raisons suivantes:
- 2.5 D1 ne contient aucun enseignement par rapport à l'utilisation de la L-cystéine base. D3 concerne une composition comprenant des *Bifidobacteria* et de la L-cystéine pour traiter la diarrhée chez les porcelets. D3 ne se rapporte pas aux inoculums pour ensemençer des substrats laitiers. En outre, ce document ne divulgue pas que la L-cystéine utilisé est de la L-cystéine base.
Donc, la personne du métier ne consulterait pas ce document.
Même en ayant D3 sous les yeux, la personne du métier n'y trouverait aucune incitation à remplacer la levure lysée par de la L-cystéine base dans l'inoculum décrit dans D1.
- 2.6 Les revendications 2-19, 22, 23 dépendent des revendications 1, 20, 21 et satisfont donc également, en tant que telles, aux conditions en ce qui concerne la nouveauté et l'activité inventive.

PCT

REQUÊTE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Réservé à l'office récepteur

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)
(12 caractères au maximum) B6515A - FP

Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION

GRANULES DE CYSTEINE ET LEURS UTILISATIONS A TITRE D'ACTIVATEURS DE CROISSANCE DE BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS LACTIS

Cadre n° II DÉPOSANT

☐ Cette personne est aussi inventeur

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

COMPAGNIE GERVAIS DANONE
17, boulevard Haussmann
75009 PARIS
FRANCE

n° de téléphone

n° de télécopieur

n° sous lequel le déposant est inscrit auprès de l'office

Nationalité (nom de l'État) :
FR

Domicile (nom de l'État) :
FR

Cette personne est
déposant pour :

☐ tous les États
désignés

☒ tous les États désignés sauf
les États-Unis d'Amérique

☐ les États-Unis d'Amérique
seulement

☐ les États indiqués dans
le cadre supplémentaire

Cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRÉSENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme:

☒ mandataire

☐ représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

PARIS Fabienne
ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD SAS
3 rue Auber
75009 PARIS
FRANCE

n° de téléphone

33.1.44.51.18.00

n° de télécopieur

33.1.42.66.08.90

n° sous lequel le mandataire est inscrit
auprès de l'office

☐ Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessus est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.

Cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.) MARCHAL Laurent 8, place de la Cholettière 91360 VILLEMORISON SUR ORGE FRANCE		Cette personne est : ☐ déposant seulement ☒ déposant et inventeur ☐ inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.) n° sous lequel le déposant est inscrit auprès de l'office
Nationalité (nom de l'État) : FR	Domicile (nom de l'État) : FR	
Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☒ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire		
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.) DHOOSCHE Xavier 35, rue Boucicaut 92260 FONTENAY AUX ROSES		Cette personne est : ☐ déposant seulement ☒ déposant et inventeur ☐ inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.) n° sous lequel le déposant est inscrit auprès de l'office
Nationalité (nom de l'État) : FR	Domicile (nom de l'État) : FR	
Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☒ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire		
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)		Cette personne est : ☐ déposant seulement ☐ déposant et inventeur ☐ inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.) n° sous lequel le déposant est inscrit auprès de l'office
Nationalité (nom de l'État) :	Domicile (nom de l'État) :	
Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire		
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)		Cette personne est : ☐ déposant seulement ☐ déposant et inventeur ☐ inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.) n° sous lequel le déposant est inscrit auprès de l'office
Nationalité (nom de l'État) :	Domicile (nom de l'État) :	
Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire		
Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)		Cette personne est : ☐ déposant seulement ☐ déposant et inventeur ☐ inventeur seulement (Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.) n° sous lequel le déposant est inscrit auprès de l'office
Nationalité (nom de l'État) :	Domicile (nom de l'État) :	
Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire		
☐ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.		

Cadre supplémentaire

Si le cadre supplémentaire n'est pas utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.

1. Si l'un des cadres du présent formulaire – à l'exception des cadres n° VIII.i) à v) pour lesquels une feuille annexe spéciale est prévue – ne suffit pas à contenir tous les renseignements : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n°..." (préciser le numéro du cadre) et fournir les renseignements conformément aux instructions données dans le cadre dans lequel la place était insuffisante; en particulier :
 - i) si plus d'une personne doit être indiquée comme déposant ou inventeur et que l'on ne dispose d'aucune "feuille annexe" : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n° III" et fournir pour chaque personne supplémentaire le même type de renseignements que ceux qui sont demandés dans le cadre n° III. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous;
 - ii) si, dans le cadre n° II ou dans l'un des sous-cadres du cadre n° III, la case "les États indiqués dans le cadre supplémentaire" est cochée : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n° II" ou "Suite du cadre n° III" ou "Suite des cadres n° II et III" (selon le cas), ainsi que le nom du ou des déposants en cause et, à côté de chaque nom, le ou les États pour lesquels la personne mentionnée a la qualité de déposant (ou, le cas échéant, la mention "brevet ARIPO", "brevet eurasiens", "brevet européen" ou "brevet OAPI");
 - iii) si, dans le cadre n° II ou dans l'un des sous-cadres du cadre n° III, l'inventeur ou l'inventeur/déposant n'a pas la qualité d'inventeur pour tous les États désignés ou pour les États-Unis d'Amérique : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n° II" ou "Suite du cadre n° III" ou "Suite des cadres n° II et III" (selon le cas), ainsi que le nom du ou des inventeurs et, à côté de chaque nom, le ou les États pour lesquels la personne mentionnée a la qualité d'inventeur (ou, le cas échéant, la mention "brevet ARIPO", "brevet eurasiens", "brevet européen" ou "brevet OAPI");
 - iv) si, en plus du ou des mandataires indiqués dans le cadre n° IV, il y a d'autres mandataires : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n° IV" et fournir pour chaque mandataire supplémentaire le même type de renseignements que ceux qui sont demandés dans le cadre n° IV;
 - v) si, dans le cadre n° VI, la priorité de plus de trois demandes antérieures est revendiquée : dans ce cas, indiquer "Suite du cadre n° VI" et fournir pour chaque demande antérieure supplémentaire le même type de renseignements que ceux qui sont demandés dans le cadre n° VI.
2. Si le déposant a l'intention d'indiquer qu'il souhaite que la demande internationale soit traitée, dans certains États désignés, comme une demande de brevet d'addition, de certificat d'addition, de certificat d'auteur d'invention additionnel ou de certificat d'utilité additionnel : dans ce cas, indiquer le nom ou le code à deux lettres de chaque État désigné en cause, ainsi que "brevet d'addition", "certificat d'addition", "certificat d'auteur d'invention additionnel" ou "certificat d'utilité additionnel", le numéro de la demande principale ou du brevet principal ou de tout autre titre de protection principal et la date de délivrance du brevet principal ou de tout autre titre de protection principal ou la date de dépôt de la demande principale (règles 4.11.a)iii) et 49bis.1.a) ou b)).
3. Si le déposant a l'intention d'indiquer qu'il souhaite que la demande internationale soit traitée, aux États-Unis d'Amérique, comme une demande de "continuation" ou de "continuation-in-part" d'une demande antérieure : dans ce cas, indiquer "États-Unis d'Amérique" ou "US" et "continuation" ou "continuation-in-part" et le numéro et la date de dépôt de la demande principale (règles 4.11.a)iv) et 49bis.1.d)).

DESAIX Anne
 VAILLANT Jeanne
 RAMEY Daniel
 GUTMANN Ernest
 SELLIN Carole
 BARBE Laurent
 PLASSERAUD Yves

Cadre n° V DÉSIGNATIONS

Le dépôt de la présente requête vaut, selon la règle 4.9.a), désignation de tous les États contractants liés par le PCT à la date du dépôt international, aux fins de la délivrance de tout titre de protection disponible et, le cas échéant, aux fins de la délivrance à la fois de brevets régionaux et nationaux.

Cependant,

- ☐ DE Allemagne n'est désignée pour aucun titre de protection nationale
- ☐ JP Japon n'est désigné pour aucun titre de protection nationale
- ☐ KR République de Corée n'est désignée pour aucun titre de protection nationale
- ☐ RU Fédération de Russie n'est désignée pour aucun titre de protection nationale

(Les cases mentionnées ci-dessus peuvent seulement être utilisées pour exclure (irrévocablement) les désignations concernées si, au moment du dépôt, la demande internationale revendique dans le cadre n° VI la priorité d'une demande nationale antérieure déposée dans l'État considéré, afin d'éviter que cette demande nationale antérieure ne cesse de produire ses effets en vertu de la législation nationale.)

Cadre n° VI REVENDICATION DE PRIORITÉ

La priorité de la ou des demandes antérieures suivantes est revendiquée :

Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année)	Numéro de la demande antérieure	Lorsque la demande antérieure est une :		
		demande nationale : pays ou membre de l'OMC	demande régionale : office régional	demande internationale : office récepteur
point 1) 13/07/2006	06/06421	FRANCE		
point 2)				
point 3)				

☐ D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire.

Transmettre une copie certifiée : l'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus sous :

☐ tous les points ☒ le point 1) ☐ le point 2) ☐ le point 3) ☐ autre, voir le cadre supplémentaire

Restaurer le droit de priorité : il est demandé à l'office récepteur de restaurer le droit de priorité concernant la ou les demandes antérieures indiquées plus haut ou dans le cadre supplémentaire sous les points _____. (Voir également les notes relatives au cadre n° VI; des renseignements complémentaires doivent être communiqués à l'appui de la requête en restauration du droit de priorité).

Incorporation par renvoi : lorsqu'un élément de la demande internationale visé à l'article 11.1)iii) d) ou e) ou une partie de la description, des revendications ou des dessins visée à la règle 20.5.a) n'est pas contenu ailleurs dans cette demande internationale mais est intégralement contenu dans une demande antérieure dont la priorité est revendiquée à la date à laquelle un ou plusieurs des éléments visés à l'article 11.1)iii) ont été initialement reçus par l'office récepteur, cet élément ou cette partie est, sous réserve de la confirmation selon la règle 20.6, incorporé par renvoi dans cette demande internationale aux fins de la règle 20.6.

Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE

Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé):

ISA / EP

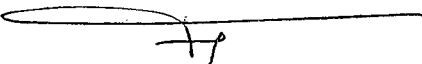
Demande d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) :

Date (jour/mois/année) Numéro Pays (ou office régional)
16/02/2007 FA N° 682994 FRANCE

Cadre n° VIII DÉCLARATIONS

Les déclarations suivantes figurent dans les cadres n° VIII.i) à v) (cocher ci-dessous la ou les cases appropriées et indiquer dans la colonne de droite le nombre de chaque type de déclaration) :

- | | | | |
|---|--|---|------------------------|
| ☐ cadre n° VIII.i) | déclaration relative à l'identité de l'inventeur | : | Nombre de déclarations |
| ☐ cadre n° VIII.ii) | déclaration relative au droit du déposant, à la date du dépôt international, de demander et d'obtenir un brevet | : | |
| ☐ cadre n° VIII.iii) | déclaration relative au droit du déposant, à la date du dépôt international, de revendiquer la priorité d'une demande antérieure | : | |
| ☐ cadre n° VIII.iv) | déclaration relative à la qualité d'inventeur (seulement aux fins de la désignation des États-Unis d'Amérique) | : | |
| ☐ cadre n° VIII.v) | déclaration relative à des divulgations non opposables ou à des exceptions au défaut de nouveauté | : | |

Cadre n° IX BORDEREAU; LANGUE DE DÉPÔT	
La présente demande internationale contient : a) sur papier le nombre de feuilles suivant : requête (y compris la ou les déclarations et les feuilles supplémentaires) : 5 description (à l'exception du listage des séquences ou des tableaux y relatifs) : 46 revendications : 5 abrégé : 1 dessins : 9 Sous-total de feuilles : 66 listage des séquences : tableaux y relatifs : <i>(pour les deux éléments, nombre réel de feuilles s'ils sont déposés sur papier, qu'ils soient ou non également déposés sous forme électronique; voir c) ci-après)</i> Nombre total de feuilles : 66 b) ☐ seulement sous forme électronique (instruction 801.a)i) i) ☐ listage des séquences ii) ☐ tableaux y relatifs c) ☐ également sous forme électronique (instruction 801.a)ii) i) ☐ listage des séquences ii) ☐ tableaux y relatifs Type et nombre de supports (disquette, CD-ROM, CD-R ou autre) sur lesquels figurent le ou les i) ☐ listage des séquences : ii) ☐ tableaux y relatifs : <i>(exemplaires supplémentaires à indiquer aux points 9.ii) ou 10.ii, dans la colonne de droite)</i>	Le ou les éléments suivants sont joints à la présente demande internationale (cocher la ou les cases appropriées et indiquer dans la colonne de droite le nombre de chaque élément) : 1. ☒ feuille de calcul des taxes : 1 2. ☐ original du pouvoir distinct : 3. ☐ original du pouvoir général : 4. ☐ copie du pouvoir général; le cas échéant, numéro de référence : 5. ☐ explication de l'absence d'une signature : 6. ☐ document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) : 7. ☐ traduction de la demande internationale en (langue) : 8. ☐ indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés : 9. ☐ listage des séquences sous forme électronique (indiquer type et nombre de supports) i) ☐ copie remise aux fins de la recherche internationale en vertu de la règle 13ter seulement (et non en tant que partie de la demande internationale) : ii) ☐ (seulement lorsque la case b)ii) ou c)ii) de la colonne de gauche est cochée) exemplaires supplémentaires, y compris, le cas échéant, copie remise aux fins de la recherche internationale en vertu de la règle 13ter : iii) ☐ avec la déclaration pertinente quant à l'identité entre la copie – ou les exemplaires supplémentaires – et le listage des séquences mentionné dans la colonne de gauche : 10. ☐ tableaux sous forme électronique relatifs au listage des séquences (indiquer type et nombre de supports) i) ☐ copie remise aux fins de la recherche internationale en vertu de l'instruction 802.b-quater) seulement (et non en tant que partie de la demande internationale) : ii) ☐ (seulement lorsque la case b)ii) ou c)ii) de la colonne de gauche est cochée) exemplaires supplémentaires, y compris, le cas échéant, copie remise aux fins de la recherche internationale en vertu de l'instruction 802.b-quater) : iii) ☐ avec la déclaration pertinente quant à l'identité entre la copie – ou les exemplaires supplémentaires – et les tableaux mentionnés dans la colonne de gauche : 11. ☒ autres éléments (préciser) : Rapport de recherche FR : 1
Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé :	Langue de dépôt de la demande internationale : Française
Cadre n° X SIGNATURE DU DÉPOSANT, DU MANDATAIRE OU DU REPRÉSENTANT COMMUN <i>À côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et à quel titre l'intéressé signe (si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête).</i> Paris, le 01/06/2007 PARIS Fabienne ERNEST GUTMANN - YVES PLASSERAUD SAS 	

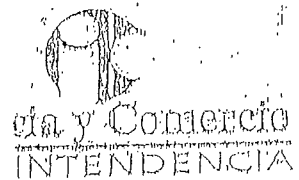
Réservé à l'office récepteur	
1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale :	2. Dessins : ☐ reçus : ☐ non reçus :
3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :	
4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :	
5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : ISA /	6. ☐ Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche

Réservé au Bureau international	
Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :	



No. 09-011069- -00000-0000

Fecha: 2009-02-05 16:52:32 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYI Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 179



REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION



MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente: ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

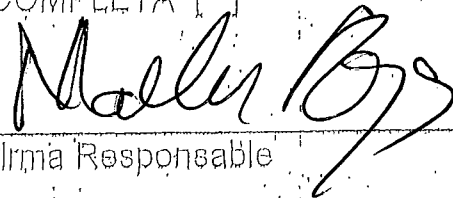
INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐


Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 6, 7 y 10
Corredor: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CADENA SARMIENTO JUAN PABLO

REFERENCIA	Radicación No.	9 11069
	Solicitud internacional	PCT/FR2007/000916
	Fecha inicio fase nacional	13/02/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	3779

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

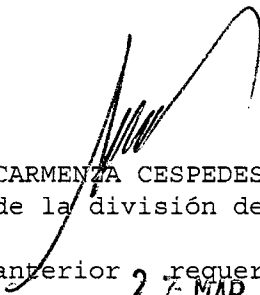
En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación No.: 9 11069



ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 27 MAR. 2009
jfernand