

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle
Bureau international



(10) Numéro de publication internationale
WO 2010/001073 A1

(43) Date de la publication internationale
7 janvier 2010 (07.01.2010)

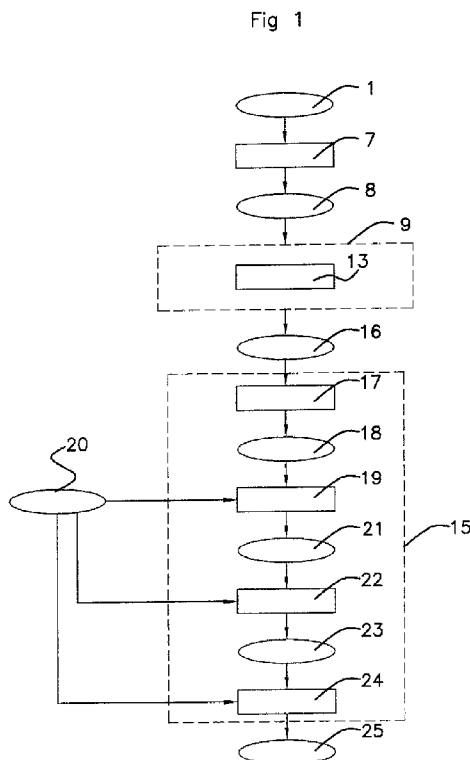
PCT

- (51) Classification internationale des brevets :
A23C 19/032 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2009/051314
- (22) Date de dépôt international :
3 juillet 2009 (03.07.2009)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
08.03808 4 juillet 2008 (04.07.2008) FR
- (71) Déposants et
(72) Inventeurs : DUMARCHÉ, Claude [FR/FR]; 32 rue du Pertuis Breton, F-17340 Chatelaillon Plage (FR).
LECLERCQ, Sébastien [FR/FR]; 8 rue de la Rozière, F-12430 Villefranche de Panat (FR).
- (74) Mandataire : CABINET BARRE LAFORGUE & ASSOCIÉS; 95 rue des Amidonniers, F-31000 Toulouse (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, 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), eurasiatique (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Suite sur la page suivante]

(54) Title : METHOD FOR PREPARING A LEAVEN FROM UNPASTEURIZED MILK, LEAVEN OBTAINED BY MEANS OF THIS METHOD AND USE OF THIS LEAVEN FOR PRODUCING A MILK PRODUCT

(54) Titre : PROCÉDÉ DE PRÉPARATION D'UN LEVAIN À PARTIR DE LAIT CRU, LEVAIN OBTENU PAR CE PROCÉDÉ ET UTILISATION DE CE LEVAIN POUR LA FABRICATION D'UN PRODUIT LAITIÈRE



(57) Abstract : The invention relates to a method, termed "bionative" method, for preparing a leaven, in which: an unpasteurized milk is selected from the group formed from unpasteurized milks of which the pH is capable of reaching, during a step of stabilizing fermentation by acidifying lactic fermentation of the unpasteurized milk, at at least one selection temperature, a value of 5.5 in more than 15 h, and a minimum value of 5.0 in less than 48 h, and then an unpasteurized milk-stabilizing treatment is carried out, said treatment comprising at least one step, termed stabilizing fermentation step, of acidifying lactic fermentation of a fermentation medium, including a first stabilizing fermentation step carried out using a fermentation medium comprising said unpasteurized milk, in which at least one stabilizing fermentation step is interrupted when the pH of the fermentation medium reaches a value of between 4.9 and 6.0.

(57) Abrégé : L'invention concerne un procédé, dit procédé « bionatif », de préparation d'un levain dans lequel : on choisit un lait cru dans le groupe formé des laits crus dont le pH

[Suite sur la page suivante]

WO 2010/001073 A1



Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues (règle 48.2.h)

est susceptible d'atteindre, lors d'une étape de fermentation stabilisante par fermentation lactique acidifiante du lait cru, à au moins une température de sélection, une valeur de 5,5 en plus de 15 h, et une valeur minimum de 5,0 en moins de 48 h, puis, on réalise un traitement de stabilisation de lait cru, ledit traitement comprenant au moins une étape, dite étape de fermentation stabilisante, de fermentation lactique acidifiante d'un milieu de fermentation, dont une première étape de fermentation stabilisante réalisée à partir d'un milieu de fermentation comprenant ledit lait cru, dans lequel on interrompt au moins une étape de fermentation stabilisante lorsque le pH du milieu de fermentation atteint une valeur comprise entre 4,9 et 6,0.

PROCÉDÉ DE PRÉPARATION D'UN LEVAIN À PARTIR DE LAIT CRU,
LEVAIN OBTENU PAR CE PROCÉDÉ ET UTILISATION DE CE LEVAIN
POUR LA FABRICATION D'UN PRODUIT LAITIER

5 L'invention concerne un procédé de préparation d'un levain à partir de lait cru, un levain obtenu par ce procédé et l'utilisation de ce levain pour la fabrication d'un produit laitier.

Les directives sanitaires visant à réduire les risques d'intoxication alimentaire en éliminant les flores pathogènes dans les produits
10 laitiers obligent les professionnels de l'industrie laitière à prendre, dans les procédés de production et de collecte des laits, des mesures drastiques d'hygiène, notamment des mesures de désinfection et de décontamination des locaux de traite, des mamelles des animaux, des dispositifs de traite et des dispositifs de stockage des laits. En outre, ces directives ont conduit à la généralisation des procédés de
15 stockage réfrigéré du lait pendant 48 h à 72 h à la ferme, notamment à une température de l'ordre de +4°C. A cet égard, le document Michel V. et al, (2001), Lait, 81, pp575-592, décrit l'impact de conditions sanitaires variées, adoptées lors de la production de laits de vache, sur la diversité biologique de la flore microbienne de ces laits crus.

20 Cependant le déclin de la quantité moyenne des flores pathogènes dans les productions laitières, résultant de la mise en œuvre de ces méthodes, s'accompagne de la diminution sensible, dans les laits crus, de la quantité moyenne des flores utiles pour la fermentation des laits et pour l'affinage de produits laitiers issus de laits crus, notamment des fromages.

25 En outre, pour satisfaire aux exigences sanitaires, visant à limiter les flores pathogènes dans les laits crus, et en même temps bénéficier d'une flore numériquement importante et adaptée pour réaliser la fermentation lactique du lait, l'industrie laitière préconise l'utilisation de ferments, appelés ferments issus de co-culture, dont la composition est parfaitement définie et aisément reproductible.
30 Ces ferments issus de co-culture sont constitués d'une souche ou d'un petit nombre de souches microbiologiques pures, sont élaborés par isolement et clonage de ces

souches pures dans des laboratoires de recherche, et sont donc exempts de germes potentiellement pathogènes. Ces ferments issus de co-culture sont, par exemple, constitués d'une combinaison d'une ou plusieurs souche(s) bactérienne(s) acidifiante(s) et d'une ou plusieurs souche(s) bactérienne(s) non acidifiantes
5 adaptées pour le typage des produits obtenus à partir de ces ferments.

Cependant, le développement des propriétés organoleptiques et les qualités sensorielles des fromages au lait cru, ainsi que leur typicité caractéristique d'une zone géographique ou géomorphologique, appelée terroir, est une conséquence directe de l'utilisation de laits crus présentant une flore
10 naturellement diversifiée, elle-même caractéristique de ce terroir. En effet, les qualités organoleptiques originales des fromages au lait cru proviennent de l'expression d'un grand nombre de molécules odorantes et gustatives de faible poids moléculaire, produites lors de dégradations enzymatiques de divers constituants, notamment protéiques, du lait. Ainsi, la richesse et la diversité microbiologique des
15 laits crus permettent l'expression d'équipements enzymatiques eux-mêmes riches et diversifiés qui sont à l'origine de la production, dans les milieux de fermentation, notamment de fermentation lactique, et dans les milieux d'affinage, de molécules à l'origine des saveurs et des odeurs caractéristiques des fromages au lait cru.

On connaît déjà différents procédés permettant de préparer un
20 concentré de cellules bactériennes à partir de souches microbiologiquement pures.

Dans un premier type de solution connue (cf. par exemple GB 1 205 733), on prépare un concentré de cellules bactériennes à partir d'une souche structurellement caractérisée et commercialement disponible de *Streptococcus cremoris*. Une telle solution ne permet pas de préparer, à partir de lait
25 cru, un levain présentant une flore microbiologique riche et diversifiée, dont la composition microbiologique est représentative de la zone géographique et des pratiques de production du lait cru.

Un deuxième type de solution connue (WO 2006/067136) semblable au précédent est un procédé de préparation rapide d'un concentré de
30 bactéries lactiques notamment de *Lactococcus lactis*, ssp *cremoris* utilisant un extrait de levure à titre d'accélérateur de croissance. Une telle solution ne permet

pas non plus de préparer, à partir de lait cru, un levain fortement diversifié.

L'invention vise à pallier ces inconvénients en proposant un procédé de préparation, à partir de lait cru, d'un levain formé d'un grand nombre d'espèces microbiologiques, notamment bactériennes, différentes.

5 L'invention vise à proposer un procédé de préparation d'un levain dont la composition comprend un grand nombre d'espèces microbiologiques différentes et regroupe l'essentiel de la flore fromagère utile du lait cru.

L'invention vise aussi à proposer un tel procédé ne faisant appel à aucun traitement du lait cru par des compositions antiseptiques, antibiotiques, bactériostatiques ou par éléments chimiques susceptibles d'inhiber ou
10 stimuler la croissance de la flore du lait cru.

L'invention vise également à proposer un tel procédé ne faisant appel à aucun ajout volontaire de micro-organisme.

L'invention vise également et plus particulièrement à proposer
15 un tel procédé qui tend à se conformer aux contraintes de sécurité sanitaire auxquelles sont soumis les producteurs de lait et l'industrie laitière.

L'invention vise de surcroît à proposer un tel procédé qui préserve les habitudes de travail des personnels, qui soit facile à utiliser, et qui n'implique pour sa mise en œuvre que peu de manipulations.

20 L'invention vise également à proposer un tel procédé réalisé à partir de moyens et de dispositifs peu onéreux.

Par ailleurs, l'invention vise à proposer un levain, notamment mais pas exclusivement un levain obtenu par un tel procédé, et constitué d'un grand nombre d'espèces microbiologiques regroupant l'essentiel de la flore fromagère
25 utile du lait cru.

L'invention vise en outre à proposer un tel levain regroupant l'essentiel de la flore native du lait cru diminuée cependant de la flore pathogène et de la flore susceptible d'altérer les qualités organoleptiques des produits laitiers obtenus ultérieurement avec un tel levain.

30 L'invention vise à proposer un tel levain susceptible d'être utilisé en particulier pour la fabrication, à partir de lait traité par thermisation, par

microfiltration, ou encore par pasteurisation, de produits laitiers, notamment de fromages, présentant des caractéristiques organoleptiques s'approchant de celles de produits laitiers élaborés directement à partir de laits crus.

L'invention vise en outre à proposer un tel levain biodiversifié
5 constitué d'un grand nombre d'espèces microbiologiques et présentant une résistance accrue aux accidents de fermentation, notamment aux accidents lytiques provoqués par des bactériophages.

L'invention vise en outre à proposer un tel levain biodiversifié, constitué d'un grand nombre d'espèces microbiologiques, qui est
10 résistant au développement ultérieur de micro-organismes pathogènes dans le levain, notamment par un effet de compétition trophique, dit effet barrière, lors d'une contamination de faible ampleur.

L'invention vise en outre à proposer un levain présentant une diversité microbiologique garantissant la stabilité du levain, la conservation de ses
15 propriétés organoleptiques et permettant sa commercialisation.

L'invention vise en outre à proposer un levain fabriqué à partir de lait cru, répondant aux critères actuels de qualité sanitaire.

L'invention vise également à proposer un tel levain dont la composition microbiologique est représentative de la typicité d'une zone
20 géographique présentant des caractéristiques communes, de la spécificité des pratiques agricoles et laitières de cette zone géographique, et de ses flores saisonnières.

L'invention vise également à proposer un tel levain de faible coût de revient.

25 Un autre objectif de l'invention est de proposer l'utilisation d'un tel levain pour conférer aux aliments fabriqués à partir de ce levain des propriétés organoleptiques, notamment des arômes, des goûts et des textures, typiques d'une zone géographique.

L'invention vise en outre l'utilisation d'un tel levain pour
30 apporter, à des aliments fermentés fabriqués à partir de ce levain, une flore microbienne variée, équilibrée et vivante.

L'invention vise en outre l'utilisation d'un tel levain pour la préparation d'un probiotique alimentaire comprenant des micro-organismes vivants et diversifiés susceptible de limiter le développement de micro-organismes néfastes, notamment de micro-organismes pathogènes opportunistes.

5 L'invention vise en outre l'utilisation d'un tel levain pour une production fromagère homogène, reproductible et présentant un rendement élevé de production.

Dans toute la suite :

- 10 - le terme « lait cru » désigne non seulement un lait qui n'a subi aucun traitement à une température supérieure à la température du lait en sortie de mamelle, mais aussi plus largement un lait qui n'a subi aucun traitement physique ou thermique susceptible d'éliminer ou de détruire des germes microbiologiques. On sait que le lait cru produit par des animaux sains est sensiblement stérile en sortie de la mamelle, et que la
15 flore présente dans le lait cru après la traite est constituée de micro-organismes exogènes caractéristiques de l'environnement de production de ce lait cru.
- 20 - le terme « flore utile » désigne l'ensemble de la flore du lait cru participant à la maturation, à l'acidification et à la coagulation du lait cru et au développement de la flore de surface. La flore utile, aussi appelée flore fromagère ou encore flore technologique, comprend par exemple, et à titre non limitatif, les lactocoques, notamment *Lactococcus cremoris*, *Lactococcus diacetylactis*, les lactobacilles et les bactéries du genre *Leuconostoc*.
- 25 - le terme « flore néfaste » désigne l'ensemble de la flore du lait contribuant à l'altération soit des propriétés organoleptiques (flore d'altération), soit de la qualité sanitaire (flore pathogène) du produit laitier final. La flore d'altération comprend notamment la famille de *Pseudomonas* et des bactéries coliformes en général. La flore pathogène
30 comprend les Staphylocoques à coagulase positive, notamment *Staphylococcus aureus*, la famille des Listéria, notamment *Listeria*

monocytogenes, les salmonelles et *Escherichia coli*.

L'invention concerne donc un procédé de préparation d'un levain dans lequel :

- 5 - on choisit un lait cru dans le groupe formé des laits crus dont le pH est susceptible d'atteindre, lors d'une étape, dite étape de sélection, de fermentation stabilisante par fermentation lactique acidifiante du lait cru, à au moins une température, dite température de sélection, comprise entre 20°C et 42°C, une valeur de 5,5 en plus de 15 h, et une valeur minimum de 5,0 en moins de 48 h, puis,
- 10 - on réalise un traitement de stabilisation de lait cru, ledit traitement comprenant au moins une étape, dite étape de fermentation stabilisante, de fermentation lactique acidifiante d'un milieu de fermentation, dont une première étape de fermentation stabilisante réalisée à partir d'un milieu de fermentation comprenant ledit lait cru, dans lequel on interrompt au moins
15 une étape de fermentation stabilisante dudit traitement lorsque le pH du milieu de fermentation atteint une valeur comprise entre 4,6 et 6,0 - notamment une valeur comprise entre 4,9 et 5,6- en particulier une valeur de l'ordre de 5,2.

Les laits crus produits dans des exploitations laitières
20 respectant les normes sanitaires actuellement en vigueur, présentent une densité microbiologique globalement faible, notamment une densité microbiologique sensiblement inférieure à celle des laits crus produits dans des exploitations laitières ne respectant pas ces directives sanitaires. Cependant ces laits crus, présentant une densité microbiologique globalement faible, contiennent néanmoins une flore
25 microbiologique suffisamment nombreuse et diversifiée pour permettre l'élaboration de levains, présentant une flore diversifiée, susceptibles de typer les produits obtenus à partir de ces levains.

Les inventeurs ont constaté que, quelle que soit leur origine et leur nature, la plupart des laits crus produits dans ces exploitations laitières peuvent
30 être avantageusement enrichis en flore utile par un traitement de stabilisation comprenant au moins une étape de fermentation stabilisante dans laquelle on

interrompt la fermentation lactique acidifiante lorsque le pH du milieu de fermentation atteint une valeur comprise entre 4,6 et 6,0 -notamment une valeur comprise entre 4,9 et 5,6-, en particulier une valeur de l'ordre de 5,2.

D'autre part, ce traitement de stabilisation permet non seulement d'augmenter le titre microbiologique du milieu de fermentation, mais également de favoriser le développement, dans le milieu de fermentation, des flores utiles aux dépens des flores d'altération et des flores pathogènes dudit milieu de fermentation.

Les inventeurs ont constaté avec surprise que l'interruption de la fermentation lactique acidifiante lorsque le pH du milieu de fermentation atteint une valeur comprise entre 4,6 et 6,0 -notamment une valeur comprise entre 4,9 et 5,6-, en particulier une valeur de l'ordre de 5,2, permet, quelle que soit l'origine et la nature du lait cru, de favoriser la croissance des micro-organismes hétérofermentaires de la flore utile du milieu de fermentation tout en limitant la croissance des micro-organismes acidophiles stricts. En outre, cette interruption permet de modifier, de façon différentielle, les taux de croissance respectifs des différentes flores présentes dans le milieu de fermentation, et d'enrichir le milieu de fermentation en flores fromagères diversifiées issues du lait cru.

Les inventeurs ont observé qu'il est possible de choisir les laits crus susceptibles d'être utilisés pour la préparation d'un levain selon l'invention en réalisant une fermentation lactique acidifiante à une température, dite température de sélection, adaptée pour permettre la croissance de la flore du lait cru, ladite température de sélection étant comprise entre 20°C et 42°C, notamment de l'ordre de 27°C, et en sélectionnant les laits fermentés dont le pH atteint la valeur de 5,5 en plus de 15 h, et la valeur minimale de 5,0 en moins de 48 h. Ainsi, on sélectionne des laits crus dont la flore est diversifiée et adaptée pour réaliser une acidification lente du lait cru à au moins une température de sélection.

Avantageusement et selon l'invention, on réalise cette étape d'identification et de sélection des laits crus susceptibles d'être utilisés pour la préparation d'un levain, à une température de sélection de l'ordre de 27°C, notamment à la température de 27°C, de façon à sélectionner les laits crus riches en

flores mésophiles présentant cette double propriété d'acidification lente et stabilisante. Le lait ainsi sélectionné est un lait cru riche en flores mésophiles qui, à la température de sélection de 27°C, permettent une acidification lente d'un milieu de fermentation d'une première étape de fermentation stabilisante selon l'invention.

5 On peut qualifier un tel procédé selon l'invention de procédé « bionatif ». En effet, il tire avantage de la biodiversité du lait et en particulier de la biodiversité du lait cru natif. Par extension on qualifiera de « levain natif » un tel levain selon l'invention obtenu par un procédé « bionatif » selon l'invention.

Avantageusement et selon l'invention, on réalise ladite
10 première étape de fermentation stabilisante sans ajout ni retranchement artificiel d'espèces microbiologiques au/du lait cru. En particulier, on réalise chaque étape de fermentation stabilisante sans ajout ni retranchement artificiel d'espèces microbiologiques au/du lait cru.

Avantageusement et selon l'invention, on réalise chaque étape
15 de fermentation stabilisante à une température prédéterminée comprise entre 18°C et 35°C, notamment à une température prédéterminée comprise entre 23°C et 30°C, particulièrement à une température prédéterminée de l'ordre de 27°C. Avantageusement, on réalise chaque étape de fermentation stabilisante à une température prédéterminée de 27°C. Les inventeurs ont observé qu'une température
20 prédéterminée comprise entre 18°C et 35°C, notamment une température prédéterminée comprise entre 23°C et 30°C, particulièrement une température prédéterminée de l'ordre de 27°C est adaptée pour favoriser la croissance des micro-organismes mésophiles dans le milieu de fermentation, notamment des micro-organismes mésophiles hétérofermentaires de la flore utile. Plus
25 particulièrement, une telle température prédéterminée d'une étape de fermentation stabilisante est adaptée pour permettre la diminution de la proportion de la flore d'altération par rapport à la flore totale dans le milieu de fermentation. Encore plus particulièrement, une telle température prédéterminée d'une étape de fermentation stabilisante est adaptée pour favoriser la flore thermo-tolérante présentant des
30 conditions optimales de croissance proches des conditions de croissance de la flore thermophile et augmenter la biodiversité de la flore du milieu de fermentation.

Avantageusement et selon l'invention, on interrompt la première étape de fermentation stabilisante après une durée de fermentation lactique acidifiante du milieu de fermentation comprise entre 12 h et 36 h, en particulier entre 17 h et 24 h.

5 Les inventeurs ont observé que l'acidification lente d'un milieu de fermentation lors d'une première étape de fermentation stabilisante, en particulier une acidification permettant de diminuer le pH du milieu de fermentation à une valeur comprise entre 4,6 et 6,0 -notamment à une valeur comprise entre 4,9 et 5,6- en particulier à une valeur de l'ordre de 5,2, en plus de 12 h et en moins de
10 36 h, notamment en plus de 17 h et en moins de 24 h, permet d'amplifier la flore constitutive du milieu de fermentation.

En l'espèce, les inventeurs ont observé que l'amplification de la flore constitutive du milieu de fermentation lors d'une première étape de fermentation stabilisante ne conduit pas à une sélection d'un petit nombre d'espèces
15 microbiologiques du milieu de fermentation (ni donc à une réduction du nombre d'espèces microbiologiques présentes dans ledit milieu de fermentation), mais au contraire à la croissance de l'essentiel des espèces microbiennes initialement présentes dans le milieu de fermentation.

En outre, une telle étape de fermentation stabilisante d'un
20 milieu de fermentation formé d'un lait cru permet de modifier les proportions relatives des différentes espèces microbiologiques présentes dans le milieu de fermentation, tout en conservant l'essentiel des espèces microbiologiques constitutives de la flore utile nécessaire à l'élaboration d'un levain, dont la biodiversité est représentative de la biodiversité de la flore microbiologique
25 constitutive du lait cru ayant servi à sa préparation.

Avantageusement et selon l'invention, le milieu de fermentation de la première étape de fermentation stabilisante est un lait cru issu de mammifère, notamment un lait cru choisi dans le groupe formé du lait cru issu de vache, du lait cru issu de brebis, du lait cru issu de chèvre et du lait cru issu de
30 bufflonne. En particulier, le milieu de fermentation d'une première étape de fermentation stabilisante est un lait cru issu d'animaux de la classe des mammifères,

à l'exception des laits issus d'animaux faisant partie de l'ordre des monotrèmes.

En effet, les inventeurs ont observé que l'acidification lente d'un milieu de fermentation formé d'un lait cru, lors d'une première étape de fermentation stabilisante, en particulier une acidification permettant de diminuer le
5 pH du milieu de fermentation à une valeur comprise entre 4,6 et 6,0 -notamment à une valeur comprise entre 4,9 et 5,6-, en particulier à une valeur de l'ordre de 5,2, en plus de 12 h et en moins de 36 h, notamment en plus de 17 h et en moins de 24 h, permet d'amplifier l'essentiel de la flore -notamment de la flore utile- constitutive du lait cru.

10 En particulier, une telle étape de fermentation stabilisante lente d'un milieu de fermentation formé d'un lait cru permet de diminuer la proportion de la flore d'altération dans des laits riches en flores d'altération au profit de flores utiles diversifiées dans le milieu de fermentation à pH sensiblement compris entre 4,6 et 6,0 -notamment à une valeur comprise entre 4,9 et 5,6-, en
15 particulier à une valeur de l'ordre de 5,2 obtenu à l'issue d'une première étape de fermentation stabilisante d'un traitement de stabilisation.

Ce résultat surprenant n'a pas d'explication claire. Les inventeurs pensent qu'il pourrait être dû, au moins en partie, au fait que l'acidification lente d'un milieu de fermentation formé d'un lait cru génère, au cours
20 de l'acidification lente, des conditions physico-chimiques variées susceptibles de permettre la croissance de la flore utile et en permettant l'établissement d'un équilibre stable entre toutes les espèces microbiologiques constitutives du milieu de fermentation.

En outre, l'amplification de l'essentiel des espèces
25 microbiologiques de la flore utile dans le milieu de fermentation lors d'une première étape de fermentation stabilisante, s'accompagne aussi d'une augmentation de la proportion des bactéries coliformes, notamment des bactéries pathogènes du genre *Escherichia coli*, dans ledit milieu de fermentation. Les inventeurs ont observé avec surprise que la proportion de bactéries coliformes,
30 notamment des bactéries pathogènes du genre *Escherichia coli* du milieu de fermentation à l'issue de la première étape de fermentation stabilisante, décroît dans

les milieux de fermentation formés à l'issue des étapes ultérieures de fermentation stabilisante.

Avantageusement et selon l'invention, le milieu de fermentation de la première étape de fermentation stabilisante comprend des micro-organismes vivants à une concentration comprise entre $5 \cdot 10^3$ et $5 \cdot 10^5$ micro-organismes vivants/mL. Particulièrement, il est possible que le milieu de fermentation de la première étape de fermentation stabilisante soit un lait cru propre, c'est-à-dire comprenant de l'ordre de 10^4 micro-organismes vivants/mL. Il est aussi possible que le milieu de fermentation de la première étape de fermentation stabilisante soit un lait cru comprenant plus de 10^5 micro-organismes vivants/mL, - notamment de l'ordre de $2 \cdot 10^5$ micro-organismes vivants/mL-. Il est aussi possible que le milieu de fermentation, formé d'un lait cru, de la première étape de fermentation stabilisante soit un lait cru ultra-propre comprenant moins de 10^4 micro-organismes vivants/mL -notamment de l'ordre de $5 \cdot 10^3$ micro-organismes vivants/mL-. De façon générale, le milieu de fermentation, formé d'un lait cru, de la première étape de fermentation stabilisante est un lait cru exempt de micro-organismes pathogènes des genres *Listeria* et *Salmonella*.

Avantageusement et selon l'invention, on réalise au moins deux -notamment six- étapes successives de fermentation stabilisante, chaque étape de fermentation stabilisante étant interrompue (une interruption de la fermentation étant réalisée entre les deux étapes successives). En particulier, on réalise après une première étape de fermentation stabilisante d'un lait cru, une succession de plusieurs étapes ultérieures de fermentation stabilisante d'un traitement selon l'invention de façon à appauvrir le milieu de fermentation en flore d'altération, en flores coliformes et en bactéries du genre *Escherichia coli* et de façon à enrichir le milieu de fermentation en flore utile. Particulièrement, les inventeurs ont observé que la réalisation de six étapes de fermentation stabilisante successives à partir d'un lait cru permet d'obtenir, à l'issue des six étapes de fermentation stabilisante, un milieu de fermentation dont la valeur de pH est sensiblement comprise entre 4,6 et 6,0 -notamment comprise entre 4,9 et 5,6-, en particulier de l'ordre de 5,2, contenant une proportion de l'ordre de quelques micro-organismes, notamment de 1

à 10 micro-organismes, appartenant à la flore d'altération pour 10^6 micro-organismes totaux. En variante, et avantageusement, on réalise au moins dix étapes de fermentation stabilisante successives à partir d'un lait cru le nombre d'étapes de fermentation stabilisante successives étant adapté pour obtenir une telle proportion
5 de la flore d'altération par rapport à la flore totale.

Or, les inventeurs ont constaté de façon surprenante que l'accroissement de la proportion des bactéries coliformes, notamment des bactéries pathogènes du genre *Escherichia coli*, par rapport à la flore totale, de façon concomitante à la diminution de la proportion de la flore d'altération, dans le milieu
10 de fermentation formé d'un lait cru d'une première étape de fermentation stabilisante, est une caractéristique propre à cette première étape de fermentation stabilisante d'un milieu de fermentation formé d'un lait cru. En effet, lors d'étapes ultérieures de fermentation stabilisante d'un traitement de stabilisation, la proportion des bactéries coliformes, notamment des bactéries pathogènes du genre
15 *Escherichia coli* par rapport à la flore totale, diminue dans les milieux de fermentation successifs des étapes ultérieures de fermentation stabilisante, jusqu'à atteindre, par exemple, une valeur inférieure à 0,01%, notamment de l'ordre de 0,001%, voire même une quantité non-détectable de germe pathogène du genre *Escherichia coli*. Ainsi dans le milieu de fermentation d'une étape ultérieure de
20 fermentation stabilisante d'un traitement de stabilisation, le nombre total de micro-organismes atteint une valeur de l'ordre de $2 \cdot 10^9$ micro-organismes/mL, tandis que la proportion des bactéries du genre *Escherichia coli* par rapport à la flore totale, diminue jusqu'à atteindre, une valeur inférieure à 0,01%, notamment de l'ordre de 0,001%, en particulier une valeur nulle.

25 Il est à noter que cette proportion des bactéries du genre *Escherichia coli* par rapport à la flore totale dans un milieu de fermentation d'une étape ultérieure de fermentation stabilisante est sensiblement inférieure à la proportion de ces mêmes bactéries du genre *Escherichia coli* par rapport à la flore totale dans un lait cru.

30 Les inventeurs ont observé que dans un milieu de fermentation d'une étape ultérieure de fermentation stabilisante, la proportion des

bactéries *Escherichia coli* dans les milieux de fermentation d'étapes ultérieures de fermentation stabilisante successives diminue jusqu'à atteindre une proportion de l'ordre de quelques bactéries du genre *Escherichia coli* pour 10^6 micro-organismes totaux.

5 Dans un milieu de fermentation d'une étape ultérieure de fermentation stabilisante, la proportion des coliformes, des staphylocoques, des levures et des moisissures diminue lors des étapes successives de fermentation stabilisante jusqu'à ce que ces espèces ne soient plus détectables dans le milieu de fermentation d'une fermentation stabilisante ultime.

10 En particulier, les inventeurs ont observé que la réalisation d'une pluralité d'étapes successives de fermentation stabilisante conduit à la stabilisation d'un écosystème complexe formé des micro-organismes vivants constitutifs de la flore utile du lait cru et dont la composition est diversifiée et stable. De façon encore plus surprenante, les inventeurs ont constaté que la
15 réalisation d'une pluralité d'étapes successives de fermentation stabilisante conduit à un écosystème sensiblement exempt de flore d'altération et de flore pathogène.

Ainsi, contrairement à un ferment issu de co-culture formé d'un petit nombre de souches de micro-organismes, notamment une, deux ou trois souche(s) de micro-organisme(s), qui ne se stabilise pas à l'identique lors de
20 repiquages successifs et tend vers la sélection d'une souche unique qui se développe seule au sein de l'écosystème, le procédé selon l'invention permet la stabilisation d'un écosystème complexe, comprenant plusieurs dizaines de souches différentes de micro-organismes issus du lait cru, et comprenant en particulier l'essentiel de la flore utile dudit lait cru.

25 En particulier, les inventeurs ont observé que les cinétiques d'acidification des milieux de fermentation des étapes successives ultérieures de fermentation stabilisante d'un traitement de stabilisation présentent des profils sensiblement similaires. En particulier, ces profils présentent une phase de latence dont la durée est sensiblement conservée d'une étape à l'autre et une phase
30 d'acidification rapide dont la valeur absolue maximale de la pente est sensiblement conservée d'une étape à l'autre.

Avantageusement et selon l'invention, on interrompt chaque étape de fermentation stabilisante par refroidissement du milieu de fermentation à une température inférieure à +4 °C, notamment à une température comprise entre 0°C et +4°C. Ainsi, on interrompt la fermentation lactique acidifiante dudit milieu
5 de fermentation sans addition de substance visant à modifier les propriétés physico-chimiques, notamment les propriétés acido-basiques, et biologiques dudit milieu de fermentation. Une telle température comprise entre 0°C et +4°C est adaptée pour permettre un refroidissement rapide du milieu de fermentation issu de l'étape de fermentation et pour préserver sensiblement la totalité du potentiel de revivification
10 des flores contenues dans ce milieu. Une telle température de refroidissement du milieu de fermentation est en outre adaptée pour éviter une croissance préférentielle des micro-organismes psychrophiles lors du refroidissement et de la conservation du milieu de fermentation.

Avantageusement et selon l'invention, on réalise au moins une
15 étape, dite étape ultérieure de fermentation stabilisante, après la première étape de fermentation stabilisante, à partir d'un milieu de fermentation formé d'une quantité d'un milieu de culture liquide et d'une quantité d'un milieu de fermentation, dit milieu de fermentation précédent, obtenu à l'issue d'une étape précédente de fermentation stabilisante, dans un rapport volumique de la quantité de milieu de
20 fermentation précédent sur la quantité de milieu de fermentation compris entre 0,5% et 25%, notamment compris entre 1% et 5%, en particulier de l'ordre de 2 %.

Avantageusement et selon l'invention, le milieu de culture liquide est un jus lactosé, stérilisé et osmosé, contenant entre 4% et 20% en masse d'extrait sec, notamment 12% en masse d'extrait sec. Un jus lactosé, stérilisé et
25 osmosé, selon la présente invention est un liquide stérilisé, contenant du lactose, dont les caractères salins et vitaminés sont équilibrés. En particulier, le milieu de culture liquide est choisi dans le groupe formé des laits d'origine naturelle, des laits standardisés et des laits reconstitués, susceptibles de subir une acidification par des bactéries lactiques. Plus particulièrement, le milieu de culture liquide est un lait
30 d'origine naturelle choisi dans le groupe formé des laits pasteurisés, des laits thermisés et des laits micro-filtrés ou de tout autre lait d'origine naturelle.

Avantageusement et selon l'invention, le pH du milieu de culture liquide est compris entre 6,5 et 7,0, notamment sensiblement de l'ordre de 6,6. Les inventeurs ont observé qu'un milieu de culture formé d'un lait contenant entre 4% et 20% en masse d'extrait sec présente un pouvoir tampon suffisant pour
5 permettre sensiblement la neutralisation de l'acidité du milieu de fermentation obtenu par mélange d'une quantité du milieu de culture liquide et d'une quantité du milieu de fermentation précédent dont la valeur de pH est comprise entre 4,6 et 6,0 - notamment comprise entre 4,9 et 5,6-, en particulier de l'ordre de 5,2, d'une étape de fermentation stabilisante précédente.

10 Avantageusement et selon l'invention, ledit milieu de fermentation précédent présente une valeur de pH comprise entre 4,6 et 6,0 - notamment entre 4,9 et 5,6-, en particulier de l'ordre de 5,2, et contient entre $5 \cdot 10^7$ et $5 \cdot 10^9$ micro-organismes/mL.

En outre, avantageusement et selon l'invention, on choisit le
15 lait cru dans le groupe formé des laits crus contenant plus de $5 \cdot 10^3$ micro-organismes mésophiles/mL, on soumet ce lait cru sélectionné à une première étape de fermentation stabilisante d'un traitement de stabilisation et on interrompt ladite étape lorsque le pH du milieu de fermentation atteint une valeur comprise entre 4,6 et 6,0 -notamment comprise entre 4,9 et 5,6-, en particulier une valeur de l'ordre de
20 5,2.

Avantageusement et selon l'invention, on choisit le lait cru dans le groupe formé des laits crus dont le pH est susceptible d'atteindre, lors d'une étape, dite étape de sélection, de fermentation stabilisante par fermentation lactique acidifiante du lait cru, aux températures de sélection de 27°C et de 40°C, une valeur
25 de 5,5 en plus de 15 h, et une valeur minimum de 5,0 en moins de 48 h.

Avantageusement, on choisit le lait cru dans le groupe formé des laits crus dont le pH est susceptible d'atteindre, lors d'une étape, dite étape de sélection, de fermentation stabilisante par fermentation lactique acidifiante du lait cru, à deux températures de sélection comprises entre 20°C et 40°C, une valeur de
30 5,5 en plus de 15 h, et une valeur minimum de 5,0 en moins de 48 h

On réalise ladite étape de sélection du lait cru à deux

températures, notamment 27°C et 40°C, de façon à sélectionner des laits crus riches en flores mésophiles et/ou thermophiles.

En outre, avantageusement et selon l'invention, on choisit, préalablement à la première étape de fermentation stabilisante d'un traitement de
5 stabilisation, un lait cru dans le groupe formé des laits crus sensiblement exempts de micro-organisme pathogène, notamment du genre *Salmonella*, du genre *Listeria*, en particulier de l'espèce *Listeria monocytogenes*. En particulier, on sélectionne le lait cru dans le groupe formé des laits crus dont le taux de micro-organismes pathogènes est inférieur au seuil défini par les normes sanitaires, notamment des laits
10 susceptibles de former sur milieu de culture solide moins d'une colonie de micro-organismes pathogènes pour 25 g de lait cru testé.

Avantageusement, on fabrique un levain exclusivement à partir de lait cru, sans ajout ni retranchement artificiel d'espèces microbiologiques au/du lait cru, par un procédé selon l'invention permettant de faire disparaître les
15 staphylocoques, les levures et les moisissures du levain et permettant en outre de diminuer fortement la proportion de la flore d'hygiène, notamment la proportion de la flore coliforme, voire de la faire disparaître complètement du levain.

L'invention concerne donc un levain issu de lait cru :

- comprenant plus de 10^7 micro-organismes/mL, notamment entre $5 \cdot 10^7$ et
20 $5 \cdot 10^9$ micro-organismes/mL, et
- comprenant de 5 à 100 espèces et sous-espèces microbiologiques différentes, notamment de 5 à 30 espèces et sous-espèces identifiables, en particulier de 5 à 12 espèces et sous-espèces microbiologiques identifiables, lesdites espèces et sous-espèces microbiologiques étant issues
25 du lait cru uniquement par fermentation spontanée de celui-ci (sans ajout de levain ni retranchement artificiel d'espèces microbiologiques),

et dans lequel plus de 80% de ces espèces et sous-espèces microbiologiques contenues dans le levain sont issues de la flore utile du lait cru.

En variante, avantageusement et selon l'invention, le levain
30 est sensiblement exempt de coliformes, d'*Escherichia coli* et de staphylocoques.

Avantageusement, un levain selon l'invention contient des

micro-organismes à une concentration supérieure à 10^7 micro-organismes/mL, notamment une concentration comprise entre 5.10^7 et 5.10^9 micro-organismes/mL, lesdits micro-organismes appartenant à des espèces et sous-espèces microbiologiques issues en totalité du lait cru, c'est-à-dire sans aucun ajout ni
5 retranchement artificiel d'espèces microbiologiques au/du lait cru.

Avantageusement, le levain comprend de 5 à 100 espèces et sous-espèces microbiologiques différentes, notamment de 5 à 30 espèces et sous-espèces microbiologiques identifiables par des moyens biochimiques, microbiologiques ou génétiques connus en soi. En particulier, le levain comprend
10 entre 5 et 12 espèces et sous-espèces microbiologiques identifiables qui sont issues du lait cru uniquement par fermentation spontanée de celui-ci, sans ajout ni retranchement artificiel d'espèces et sous-espèces microbiologiques au/du levain.

On réalise les analyses microbiologiques du levain obtenu par un procédé selon l'invention par tout moyen connu en soi. En particulier, on réalise
15 ces analyses par des moyens microbiologiques de numération cellulaire, notamment par culture du levain sur des milieux de culture solide et dénombrement des colonies formées. On utilise à cet effet des milieux de culture solides dont la composition permet de sélectionner les différentes espèces microbiologiques en fonction des leurs exigences trophiques. On réalise en outre ces cultures à
20 différentes températures adaptées pour répondre aux exigences thermiques optimales de croissance de la flore du levain. On réalise en outre ces cultures dans des conditions d'aération variées susceptibles de permettre la croissance de micro-organismes aérobies, de micro-organismes anaérobies stricts, de micro-organismes anaérobies aéro-tolérants.

25 On réalise les analyses de la composition microbiologique et de la biodiversité du levain obtenu par un procédé selon l'invention par des techniques moléculaires d'amplification, de séparation et d'analyse qualitative et quantitative des acides nucléiques, notamment ADN, des différentes espèces microbiologiques constituant le levain selon l'invention, notamment par des
30 techniques de réaction en chaîne par polymérase (PCR).

L'invention concerne en outre un levain, susceptible d'être

obtenu à partir d'un lait cru par un procédé selon l'invention.

L'invention concerne en outre l'utilisation d'un levain selon l'invention pour la préparation de spécialités fermentées. L'utilisation d'un tel levain permet de conférer à la spécialité fermentée des caractéristiques organoleptiques, notamment de goût et de texture proches de celles formées à partir de lait cru. Une telle utilisation permet en outre un développement harmonieux du produit lors de son affinage. En outre, l'utilisation d'un tel levain permet d'augmenter la date limite d'utilisation optimale (D.L.U.O.) du produit fabriqué à partir du levain en apportant au produit une composition microbiologique diversifiée adaptée pour prévenir, par un effet barrière, d'éventuelles contaminations ultérieures à la préparation du produit. Une telle composition microbiologique diversifiée, apportée dans le procédé de fabrication d'un produit laitier fermenté, est adaptée pour prévenir le développement d'une espèce microbiologique majoritaire, voire unique, susceptible de détourner au profit de son développement la totalité du substrat disponible. En particulier, l'utilisation d'un tel levain permet d'éviter la production désagréable d'ammoniac en privilégiant les flores d'affinage saines.

L'utilisation d'un tel levain est adapté pour permettre une augmentation du taux d'eau liée de la spécialité fermentée par rapport à l'eau libre de celle-ci, conférant à ladite spécialité, une stabilité dans le temps, une texture avantageuse et, lors de l'affinage en cave ou sous emballage, des pertes d'eau maîtrisées et plus faibles. De telles pertes d'eau faibles et maîtrisées engendrent des augmentations du rendement de production de ladite spécialité et un intérêt économique.

L'invention concerne en outre l'utilisation d'un levain selon l'invention pour la préparation d'un produit laitier fermenté dans laquelle on réalise une fermentation d'un lait cru. En particulier on utilise un tel levain selon l'invention dans l'industrie fromagère pour la préparation d'un produit laitier fermenté de type « à pâte cuite », d'un produit laitier fermenté de type « à pâte pressée », d'un produit laitier fermenté de type « à pâtes molles », d'un produit laitier fermenté de type « à pâte lactique », d'un produit laitier fermenté de type « à

pâte persillée », des yaourts, des laits fermentés et du beurre.

L'invention concerne en outre l'utilisation d'un levain selon l'invention pour la préparation d'un produit laitier fermenté dans lequel on réalise une fermentation d'un lait, choisi dans le groupe formé des laits crus, des laits crus
5 ayant subi un traitement thermique -notamment des laits pasteurisés et des laits thermisés-, des laits crus ayant subi un traitement athermique -notamment des laits micro-filtrés-, des laits reconstitués et des laits standardisés.

En particulier, l'utilisation d'un levain selon l'invention pour la préparation d'un produit laitier fermenté à partir de lait pasteurisé, thermisé ou
10 micro-filtré, permet avantageusement de produire un produit laitier fermenté au lait pasteurisé, thermisé ou micro-filtré présentant des propriétés organoleptiques proches des propriétés organoleptiques d'un produit laitier au lait cru.

L'utilisation d'un levain selon l'invention, obtenu lors du traitement de stabilisation, permet en outre d'augmenter la reproductibilité des
15 procédés de préparation des produits laitiers fermentés par stabilisation de la composition microbiologique. En outre, l'utilisation d'un tel levain, de composition complexe, permet de prévenir le produit d'une évolution de sa maturation liée à une espèce microbiologique unique. L'utilisation d'un tel levain permet en outre d'augmenter la quantité d'eau liée au produit laitier fermenté et d'augmenter ainsi le
20 rendement de production du produit.

L'utilisation d'un levain biodiversifié selon l'invention est en particulier adaptée pour s'opposer au développement et/ou freiner la croissance de bactéries d'hygiène et/ou pathogènes, dans un milieu de fabrication d'un produit laitier fermenté, dans le produit laitier fermenté lui-même lors de sa conservation
25 évolutive. Un tel effet protecteur est en outre adapté pour prévenir de développement de bactéries d'hygiène et/ou pathogènes dans la flore intestinale au cours de la digestion du produit laitier fermenté selon l'invention.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'un levain, un levain et son utilisation caractérisés en combinaison par tout ou
30 partie des caractéristiques mentionnées ci-dessus ou ci-après.

D'autres buts, caractéristiques et avantages de l'invention

apparaîtront à la lecture de la description suivante qui se réfère aux figures annexées représentant des modes de réalisation préférentiels de l'invention, donnés uniquement à titre d'exemples non limitatifs, et dans lesquelles :

- la figure 1 est un schéma synoptique illustrant un procédé selon l'invention,
- 5 - la figure 2 est une représentation graphique de l'évolution temporelle du pH d'un milieu fermentation formé d'un lait cru comprenant de l'ordre de $2 \cdot 10^5$ micro-organismes/mL d'une première étape de fermentation stabilisante à 27°C d'un procédé selon l'invention,
- la figure 3 est une représentation graphique de l'évolution temporelle du
10 pH d'un milieu fermentation formé d'un lait cru comprenant de l'ordre de $1,1 \cdot 10^4$ micro-organismes/mL d'une première étape de fermentation stabilisante à 27°C d'un procédé selon l'invention,
- La figure 4 est une représentation en bâtonnets de la composition microbienne des milieux de fermentation successifs d'un traitement de stabilisation
15 d'un lait cru comprenant de l'ordre de $2,0 \cdot 10^5$ micro-organismes/mL.
- La figure 5 est une représentation en bâtonnets de la composition microbienne des milieux de fermentation successifs d'un traitement de stabilisation d'un lait cru comprenant de l'ordre de $1,1 \cdot 10^4$ micro-organismes/mL.
- la figure 6 est une représentation en bâtonnets de la composition
20 microbienne des milieux de fermentation successifs d'un traitement de stabilisation d'un lait cru comprenant de l'ordre de $6,5 \cdot 10^3$ micro-organismes/mL.
- la figure 7 est une représentation graphique de l'évolution temporelle de la composition microbienne d'un milieu de fermentation d'une troisième étape de fermentation stabilisante d'un traitement de stabilisation d'un lait cru comprenant
25 de l'ordre de $2,0 \cdot 10^5$ micro-organismes/mL selon l'invention,
- la figure 8 est une représentation graphique de l'évolution temporelle du pourcentage des flores d'altération dans un milieu de fermentation d'une troisième étape de fermentation stabilisante d'un traitement de stabilisation selon l'invention d'un lait cru comprenant de l'ordre de $2,0 \cdot 10^5$ micro-organismes/mL,
- 30 - la figure 9 est une représentation graphique d'un profil d'analyse électrophorétique des constituants microbiologiques d'un levain selon l'invention.

- La figure 10 est une représentation graphique d'un profil d'analyse électrophorétique des constituants microbiologiques d'un levain obtenu à partir de co-culture.

- La figure 11 est une représentation graphique d'un profil d'analyse 5 électrophorétique des constituants microbiologiques d'un lait cru.

Un mode de réalisation d'un procédé de préparation d'un levain selon l'invention est illustré par le schéma synoptique de la figure 1. On réalise un prélèvement 7 d'une quantité de lait cru dans une exploitation laitière d'un groupe 1 d'exploitations laitières représentatives d'un terroir. L'ensemble des 10 prélèvements 7 des laits crus constitue une collection 8 de prélèvements de laits crus. On réalise ce prélèvement 7 après la traite, notamment dans un délai suivant la traite inférieur à 12 h, et on soumet cette quantité de lait prélevé directement à un traitement de refroidissement adapté pour préserver durablement la composition de la flore vivante constitutive du lait cru. En particulier on réalise le traitement de 15 refroidissement d'un volume du lait cru à une température de +4°C. Le volume de lait cru soumis au traitement de refroidissement est adapté pour permettre un refroidissement rapide, notamment en moins de 1 h, de ce volume de lait cru. Le volume de lait cru soumis au traitement de refroidissement est en particulier de l'ordre de 1 L.

20 On réalise ensuite une étape 9 d'évaluation des différents laits crus de la collection 8 de laits crus de façon à identifier et à sélectionner les laits crus susceptibles de permettre la préparation d'un levain selon l'invention. L'étape 9 d'évaluation des laits crus de la collection 8 comprend au moins une étape 13 de sélection des laits crus dans laquelle on réalise, à au moins une température de 25 sélection, une fermentation lactique acidifiante du lait cru et à l'issue de laquelle on retient les laits dont le pH du milieu de fermentation a atteint une valeur de 5,5 en plus de 15 h, et une valeur minimum de 5,0 en moins de 48 h. En particulier on réalise en parallèle une étape 13 de sélection d'un lait cru à la température de 27°C et/ou à la température de 40°C, et on retient le(s) lait(s) cru(s) dont le pH du milieu 30 de fermentation lactique acidifiante à 27°C et/ou à 40°C a atteint une valeur de 5,5 en plus de 15 h, et une valeur minimum de 5,0 en moins de 48 h à 27°C et à 40°C.

On évalue ainsi le potentiel des laits crus de la collection 8 de laits crus à induire une diminution du pH d'un milieu de fermentation, par fermentation lactique acidifiante, qui soit lente et néanmoins stabilisante. On réalise cette étape 13 de sélection de lait cru dans un réacteur adapté pour permettre de mesurer, notamment 5 en continu, le pH du milieu de fermentation. En particulier, on réalise cette étape 13 de sélection dans un fermenteur permettant de maintenir la température du milieu de fermentation à une température présélectionnée. On réalise cette étape 13 de sélection sous agitation dudit milieu de fermentation. Cependant, cette agitation adaptée pour homogénéiser le milieu de fermentation n'est pas adaptée pour 10 permettre une aération du milieu de fermentation. Ainsi, la fermentation lactique acidifiante se produit sensiblement dans des conditions d'anaérobiose.

On soumet, lors d'une première étape 17 de fermentation stabilisante d'un traitement 15 de stabilisation, un milieu de fermentation formé d'un lait 16 cru présélectionné, à une fermentation lactique acidifiante, à une 15 température de 27°C, et on interrompt ladite fermentation lactique acidifiante lorsque le pH du milieu de fermentation atteint la valeur de 5,2 en plus de 12 h en moins de 24 h. On interrompt ladite fermentation lactique acidifiante par refroidissement du milieu de fermentation à une température de l'ordre de +4°C. On obtient, à l'issue de cette première étape 17 de fermentation stabilisante, un milieu 20 de fermentation formé d'un lait 18 fermenté dont le pH est de l'ordre de pH 5,2, dont la température est de l'ordre de +4°C, et dont la flore microbiologique est enrichie en regard de la flore du lait cru de départ.

Dans une deuxième étape 19 ultérieure de fermentation stabilisante, on prépare un milieu de fermentation d'une deuxième étape de 25 fermentation stabilisante, formé du mélange d'une quantité du lait 18 fermenté et d'une quantité d'un milieu 20 de culture liquide, de façon que la proportion volumique de lait 18 fermenté dans le milieu de fermentation d'une deuxième étape de fermentation stabilisante soit de l'ordre de 2%. On réalise une fermentation lactique acidifiante à 27°C du milieu de fermentation de ladite deuxième étape de 30 fermentation stabilisante et on interrompt la fermentation lactique acidifiante lorsque le pH du milieu de fermentation de la deuxième étape de fermentation

stabilisante atteint la valeur de 5,2. On interrompt ladite fermentation lactique acidifiante par refroidissement à +4°C du milieu de fermentation à pH 5,2 de la deuxième étape de fermentation stabilisante.

Dans ce mode de réalisation d'un procédé selon l'invention, on réalise une pluralité d'étapes successives de fermentation stabilisante, et le milieu de fermentation de chaque étape de fermentation stabilisante est formé d'une quantité d'un milieu 20 de culture liquide et d'une quantité d'un milieu de fermentation à pH 5,2, issu d'une étape préalable de fermentation stabilisante.

Ainsi, lors d'étapes successives 22 et 24 ultérieures de fermentation stabilisante, on prépare un milieu de fermentation pour une étape ultérieure de fermentation stabilisante d'un traitement 15 de stabilisation, formé du mélange d'une quantité d'un milieu 21, respectivement 23 de fermentation à pH 5,2, avec une quantité d'un milieu 20 de culture liquide, de façon que la proportion volumique du milieu de fermentation 21, 23 à pH 5,2 dans le milieu de fermentation d'une étape ultérieure de fermentation stabilisante soit de l'ordre de 2%. On réalise une fermentation lactique acidifiante à 27°C du milieu de fermentation d'une étape ultérieure de fermentation stabilisante et on interrompt la fermentation lactique acidifiante lorsque le pH du milieu de fermentation de l'étape ultérieure de fermentation stabilisante atteint la valeur de 5,2. On interrompt ladite fermentation lactique acidifiante par refroidissement du milieu de fermentation de l'étape ultérieure de fermentation stabilisante à une température sensiblement de l'ordre de +4°C.

Le milieu de fermentation obtenu à l'issue de l'étape 24 de fermentation stabilisante est un levain 25, présentant une concentration élevée, notamment de l'ordre de $2 \cdot 10^9$ micro-organismes/mL et comprenant l'essentiel des espèces microbiologiques constitutives de la flore utile du lait 16 cru sélectionné.

Dans un deuxième mode de réalisation non représenté d'un procédé selon l'invention, il est possible de réaliser, après l'étape 24 de fermentation stabilisante, une pluralité -notamment une ou deux- étapes ultérieures additionnelles de fermentation stabilisante d'un traitement 15 de stabilisation en réalisant une fermentation lactique acidifiante à 27°C d'un milieu de fermentation

formé d'une quantité d'un milieu de fermentation stabilisante à pH 5,2 d'une étape antérieure de fermentation stabilisante du traitement 15 de stabilisation, et d'une quantité d'un milieu 20 de culture et en interrompant ladite fermentation lactique acidifiante lorsque le pH du milieu de fermentation atteint la valeur de 5,2. On 5 interrompt ladite fermentation lactique acidifiante par refroidissement du milieu de fermentation de l'étape de fermentation stabilisante à une température sensiblement de l'ordre de +4°C.

Dans un troisième mode de réalisation non représenté d'un procédé selon l'invention, on utilise pour la préparation des milieux de fermentation 10 des étapes de fermentation stabilisante successives d'un traitement 15 de stabilisation, des milieux 20 de culture de compositions différentes que l'on mélange avec une quantité d'un milieu de fermentation issu d'une étape précédente de fermentation stabilisante.

EXEMPLE 1 : Préparation d'un levain à partir d'un lait cru 15 comprenant de l'ordre de $2 \cdot 10^5$ micro-organismes vivants/mL.

On choisit un lait cru de vache dans une exploitation laitière faisant partie d'un terroir, préalablement sélectionnée en regard des conditions d'élevage du bétail, notamment dans une exploitation laitière préconisant un mode de pâturage permanent. On prélève 1 L de ce lait que l'on conserve à +4°C jusqu'au 20 traitement de stabilisation. Ce lait présente une numération de FMAR (Flore Mésophile Aérobie Revivifiable) élevée, de l'ordre de $2 \cdot 10^5$ micro-organismes/mL. On place ce lait sous agitation, à une température de 27°C dans un fermenteur adapté pour permettre une fermentation lactique du lait cru. En particulier, on réalise cette fermentation lactique dans un fermenteur adapté pour permettre de 25 mesurer le pH du milieu de fermentation.

La figure 2 illustre la variation du pH d'un milieu de fermentation, formé d'un lait cru comprenant de l'ordre de $2 \cdot 10^5$ micro-organismes/mL, d'une première étape de fermentation stabilisante d'un traitement de stabilisation à 27°C selon l'invention. La figure 2 représente ladite variation du 30 pH du milieu de fermentation de ladite première étape de fermentation stabilisante à 27°C lorsque la fermentation lactique acidifiante n'est pas interrompue lorsque le

pH dudit milieu de fermentation atteint une valeur de l'ordre de 5,2. La durée de la phase de latence de la courbe d'acidification, définie comme la partie précoce de la cinétique au cours de laquelle la valeur du pH est sensiblement invariante, est de l'ordre de 10 h. Le pH du milieu de fermentation atteint la valeur de 6,0 après une
5 durée de fermentation lactique acidifiante de 12 h, la valeur de 5,2 après 18 h et la valeur de 4,9 après 24 h. Le pH du milieu de fermentation se stabilise à une valeur de l'ordre de 4,4 après environ 30 h de fermentation. Ainsi, pour la mise en œuvre d'un procédé selon l'invention, le milieu de fermentation de la première étape de fermentation stabilisante est un lait cru et la fermentation lactique acidifiante du
10 milieu de fermentation est avantageusement interrompue lorsque le pH du milieu de fermentation atteint 5,2, notamment dans cet exemple au bout de 18 h.

La figure 4 représente, à titre d'exemple non limitatif, l'évolution de la composition de la flore (FMAR) mésophile aérobie revivifiable (a), de la flore coliforme (b), d'*Escherichia coli* (c), des staphylocoques (d), des
15 levures (e), des moisissures (f) et de la flore utile (g) du milieu de fermentation au cours des étapes successives d'un traitement de stabilisation d'un lait cru comprenant de l'ordre de $2 \cdot 10^5$ micro-organismes/mL selon l'invention. L'analyse correspondant à la série 0 de la figure 4 (bâtonnets pleins) représente la numération microbiologique du lait cru de départ. Les analyses correspondant aux séries 1, 2, 3,
20 4, et 5 de la figure 4 représentent respectivement les numérations microbiologiques du milieu de fermentation à pH 5,2 respectivement de la première, de la deuxième, de la troisième, de la quatrième, et de la cinquième étape de fermentation stabilisante d'un traitement de stabilisation selon l'invention.

Les valeurs numériques correspondant à ces numérations sont
25 données dans le tableau 1 ci-dessous. La composition microbiologique de la flore utile (g) est détaillée dans le tableau 1 et regroupe l'ensemble des streptocoques (h), des lactocoques (i), des lactobacilles (j) et des leuconostoc (k).

	a	b	c	d	e	f	g			
							h	I	j	k
0	2,04E+5	1,3E+2	1,0E+1	5,0E+1	1,3E+2	2,8E+3	8,4E+3	4,08E+4	4,4E+3	4,24E+4
1	2,70E+9	1,06E+8	4,90E+7	5,66E+2	3,10E+7	5,0E+0	2,49E+8	2,6E+8	3,06E+8	4,52E+6
2	2,44E+9	8,20E+5	5,90E+5	nd	3,0E+5	nd	4,30E+8	5,5E+8	2,06E+8	8,5E+6
3	2,76E+9	1,03E+5	2,65E+4	nd	nd	nd	7,0E+8	7,8E+8	1,02E+8	3,0E+7
4	3,25E+9	1,50E+4	1,45E+4	nd	nd	nd	8,4E+8	1,08E+8	1,08E+8	1,44E+7
5	2,85E+9	1,20E+4	8,50E+3	nd	nd	nd	9,5E+8	4,5E+8	9,6E+7	1,13E+7

nd = non détectable

Tableau 1

Lors de la première étape de fermentation stabilisante, la numération de la FMAR (a) passe d'une valeur initiale (série 0) dans le lait cru de $2,04 \cdot 10^5$ micro-organismes/mL, à une valeur finale dans les milieux de fermentation à pH 5,2 (séries 1, 2, 3, 4 et 5) successifs de l'ordre de $2,80 \cdot 10^9$ micro-organismes/mL. La numération de la flore utile (g) passe d'une valeur initiale (série 0) dans le lait cru de $9,6 \cdot 10^5$ micro-organismes/mL, à une valeur finale dans les milieux de fermentation à pH 5,2 (séries 1, 2, 3, 4 et 5) successifs qui est stable et de l'ordre de $1,3 \cdot 10^9$ micro-organismes/mL.

En outre, la numération de la flore coliforme (c) augmente significativement d'une valeur initiale (série 0) dans le lait cru de 140 micro-organismes/mL, à une valeur dans le milieu de fermentation à pH 5,2 (série 1) de la première étape de fermentation stabilisante de $1,06 \cdot 10^8$ micro-organismes/mL, puis décroît dans les milieux de fermentation des étapes ultérieures de fermentation stabilisante successives (séries 2, 3, 4 et 5) jusqu'à une valeur de l'ordre de $1,20 \cdot 10^4$ micro-organismes/mL. Ainsi, la proportion de bactéries coliformes par rapport à la FMAR passe d'une valeur de l'ordre de 0,06% dans le lait cru, à une valeur de l'ordre de 0,0004% dans le levain obtenu après la cinquième étape de fermentation stabilisante traduisant un épuisement du levain en flores coliformes.

Une observation similaire est faite vis-à-vis des bactéries *Escherichia coli* dont la proportion par rapport à la FMAR est de 1 bactérie E.coli pour $2 \cdot 10^4$ FMAR dans le lait cru et de 1 bactérie E.coli pour $3 \cdot 10^6$ FMAR dans le

milieu de fermentation de la cinquième étape de fermentation stabilisante.

On observe en outre sur la figure 4 et dans le tableau 1 que les staphylocoques (d), les levures (e) et les moisissures (f) disparaissent totalement des milieux de fermentation successifs dès la troisième étape (série 4) de fermentation
5 stabilisante d'un traitement de stabilisation selon l'invention.

En outre, les inventeurs ont observé que les cinétiques d'acidification des milieux de fermentation des étapes de fermentation stabilisante d'un traitement de stabilisation selon l'invention sont similaires à partir de la deuxième étape de fermentation stabilisante. Ces cinétiques présentent un temps de
10 latence de l'ordre de 150 min, atteignent le pH de 6,0 entre 230 min et 260 min, le pH de 5,2 entre 290 min et 320 min et se stabilisent à un pH de l'ordre de pH 4,5 au bout de 400 min.

La figure 7 représente l'évolution des numérations bactériennes au cours de la troisième étape de fermentation stabilisante du
15 traitement de stabilisation d'un lait cru comprenant de l'ordre de $2 \cdot 10^5$ micro-organismes/mL selon l'invention, conduite à la température de 27°C et interrompue après 330 min lorsque le pH du milieu de fermentation a atteint la valeur de 5,2. La courbe (a) représente l'évolution de la flore totale (FMAR), la courbe (b) représente l'évolution de la flore formée des coliformes, et la courbe (c) représente l'évolution
20 de la flore formée d'*Escherichia coli*. On observe que la flore coliforme et la flore formée d'*Escherichia coli* présentent un taux de croissance qui diminue à partir de 200 min (pH 6,0) de fermentation lactique, alors que la flore totale (FMAR) présente un taux de croissance qui n'est pas sensiblement ralenti jusqu'à pH 5,2.

La figure 8 représente l'évolution de la numération de la flore
25 coliforme, exprimée en pourcentage de la flore totale (FMAR), dans le milieu de fermentation d'une troisième étape de fermentation stabilisante d'un procédé selon l'invention. On note que la proportion de la flore coliforme par rapport à la flore totale du milieu de fermentation lors de l'ensemencement est de 0,29 % et diminue jusqu'à la valeur de 0,06% après 120 min d'incubation (pH 6,35) et s'équilibre à la
30 valeur de 0,03% après 330 min d'incubation (pH 5,20).

La figure 9 représente une empreinte moléculaire montrant la

biodiversité microbiologique du levain obtenu par un procédé selon l'invention à partir du lait cru de l'exemple 1 comprenant de l'ordre de $2 \cdot 10^5$ micro-organismes/mL. Le profil de la figure 9 montre deux pics majeurs correspondant aux souches microbiologiques lactofermentaires majeures du levain. En outre, le
5 profil montre huit pics d'intensité intermédiaire caractérisant au moins huit espèces microbiologiques différentes dans le levain selon l'invention. Enfin le profil révèle une multiplicité de signaux de faible intensité mais caractérisant une biodiversité importante du levain selon l'invention élaboré à partir de lait cru.

En outre, le profil d'analyse, à titre de contrôle, d'un lait cru
10 tel qu'utilisé pour la préparation d'un levain selon l'invention, présente un pic majeur correspondant à une souche microbiologique lactofermentaire du lait cru, huit pics d'intensité intermédiaire, et une multiplicité de signaux de faible intensité caractéristique de la biodiversité du lait cru. Ce contrôle montre qu'un procédé de
15 préparation d'un levain selon l'invention permet de conserver l'essentiel de la biodiversité du lait cru à l'origine du levain préparé.

La figure 10 représente à titre de contrôle comparatif un profil d'analyse d'un levain obtenu à partir de co-culture montrant deux pics majeurs correspondant aux souches microbiologiques lactofermentaires, et deux pics d'intensité intermédiaire. En outre, le profil ne révèle pas de signaux de faible
20 intensité révélateurs d'une biodiversité importante du levain.

La figure 11 représente une empreinte ADN d'un lait cru, donné à titre de comparaison des compositions respectives d'un lait cru et d'un levain obtenu par un procédé selon l'invention. On observe que l'empreinte ADN du levain selon l'invention est comparable à celle du lait cru de référence, révélant
25 ainsi la quasi-conservation de la biodiversité du levain par rapport au lait cru.

EXEMPLE 2 : Préparation d'un levain à partir d'un lait cru comprenant de l'ordre de $1 \cdot 10^4$ micro-organismes/mL.

On prélève 1 L d'un lait cru de vache présentant une numération de FMAR (Flore Mésophile Aérobie Revivifiable) faible de l'ordre de
30 $1 \cdot 10^4$ micro-organismes/mL. On traite ce lait cru dans des conditions semblables à celles décrites dans l'exemple 1.

La figure 3 illustre un exemple de la variation du pH d'un milieu de fermentation, formé d'un lait cru comprenant de l'ordre de $1,1 \cdot 10^4$ micro-organismes/mL, d'une première étape de fermentation stabilisante d'un traitement de stabilisation à 27°C selon l'invention. La figure 3 représente ladite variation du pH du milieu de fermentation de ladite première étape de fermentation stabilisante à 27°C lorsque la fermentation lactique acidifiante n'est pas interrompue lorsque le pH dudit milieu de fermentation atteint une valeur de l'ordre de 5,2. La durée de la phase de latence, définie comme la partie précoce de la cinétique au cours de laquelle la valeur du pH est sensiblement invariante, est de l'ordre de 15 h. Le pH du milieu de fermentation atteint la valeur de 6,0 après une durée de fermentation lactique acidifiante de 16 h, la valeur de 5,2 après 18 h et la valeur de 4,9 après 19 h. Le pH du milieu de fermentation se stabilise à une valeur de l'ordre de 4,3 en environ 30 h. Ainsi, pour la mise en œuvre d'un procédé selon l'invention, le milieu de fermentation de la première étape de fermentation stabilisante est un lait cru et la fermentation lactique acidifiante du milieu de fermentation serait avantageusement interrompue lorsque le pH du milieu de fermentation atteint 5,2, notamment au bout de 18 h.

La figure 5 représente l'évolution de la composition de la flore (FMAR) mésophile aérobie revivifiable (a), de la flore coliforme (b), d'*Escherichia coli* (c), des staphylocoques (d), des levures (e), des moisissures (f) et de la flore utile (g) du milieu de fermentation au cours des étapes successives d'un traitement de stabilisation d'un lait cru comprenant de l'ordre de $1,1 \cdot 10^4$ micro-organismes/mL. L'analyse correspondant à la série 0 de la figure 5 (bâtonnets pleins) représente la numération du lait cru de départ. Les analyses correspondant aux séries 1, 2, 3, 4, et 5 de la figure 5 représentent respectivement les numérations du milieu de fermentation à pH 5,2 respectivement de la première, de la deuxième, de la troisième, de la quatrième, et de la cinquième étape de fermentation stabilisante du traitement de stabilisation.

Les valeurs numériques correspondant à ces numérations sont données dans le tableau 2 ci-dessous. La composition microbiologique de la flore utile (g) détaillée dans le tableau 2 regroupe l'ensemble des streptocoques (h), des

lactocoques (i), des lactobacilles (j) et des leuconostoc (k). Dans le tableau 2, nd signifie non détectable.

	a	b	c	d	e	f	g			
							h	i	j	k
0	1,1E+4	2,2E+2	2,0E+1	3,0E+1	2,0E+2	4,0E+1	4,1E+3	1,3E+3	4,0E+2	1,2E+2
1	2,72E+9	3,84E+7	3,84E+7	1,6E+3	2,4E+7	nd	2,0E+8	2,32E+8	8,0E+8	9,6E+7
2	6,3E+8	8,4E+6	8,4E+6	nd	nd	nd	4,5E+7	3,5E+7	1,53E+8	3,0E+6
3	8,4E+8	1,5E+5	1,5E+5	nd	nd	nd	1,16E+8	1,16E+8	2,5E+8	1,1E+6
4	1,76E+9	2,3E+4	2,3E+4	nd	nd	nd	1,08E+8	1,88E+8	1,16E+8	7,4E+6
5	1,6E+9	2,5E+4	2,5E+4	nd	nd	nd	4,2E+8	1,08E+9	1,52E+8	1,3E+8

nd = non détectable

5

Tableau 2

Lors de la première étape de fermentation stabilisante, la numération de la FMAR (a) passe d'une valeur initiale (série 0) dans le lait cru de $1,1 \cdot 10^4$ micro-organismes/mL, à une valeur finale dans les milieux de fermentation à pH 5,2 (séries 1, 2, 3, 4 et 5) successifs de l'ordre de $1,2 \cdot 10^9$ micro-organismes/mL. La numération de la flore utile (g) passe d'une valeur initiale (série 0) dans le lait cru de $5,9 \cdot 10^3$ micro-organismes/mL, à une valeur finale moyenne dans les milieux de fermentation à pH 5,2 (séries 1, 2, 3, 4 et 5) successifs qui est stable et de l'ordre de $1,06 \cdot 10^9$ micro-organismes/mL.

En outre, la numération de la flore coliforme (c) augmente significativement d'une valeur initiale (série 0) dans le lait cru de 220 micro-organismes/mL, à une valeur dans le milieu de fermentation à pH 5,2 (série 1) de la première étape de fermentation stabilisante de $3,84 \cdot 10^7$ micro-organismes/mL, puis décroît dans les milieux de fermentation des étapes ultérieures de fermentation stabilisante successives (séries 2, 3, 4 et 5) jusqu'à une valeur de l'ordre de $2,50 \cdot 10^4$ micro-organismes/mL. Ainsi, la proportion de bactéries coliformes par rapport à la FMAR passe d'une valeur de l'ordre de 2% dans le lait cru, à une valeur de l'ordre de 0,0015% dans le levain obtenu après la cinquième étape de fermentation stabilisante traduisant ainsi un appauvrissement de la flore coliforme du levain.

On observe également que les bactéries *Escherichia coli* dont la proportion par rapport à la FMAR est de 1 bactérie *Escherichia coli* pour 550 bactéries de la flore totale (FMAR) dans le lait cru et de 1 bactérie *Escherichia coli* pour $6,4 \cdot 10^4$ FMAR dans le milieu de fermentation de la cinquième étape de fermentation stabilisante traduisant ainsi un appauvrissement des bactéries *Escherichia coli* du levain.

On observe en outre sur la figure 5 et dans le tableau 2 que les staphylocoques (d), les levures (e) et les moisissures (f) disparaissent totalement des milieux de fermentation successifs dès la deuxième étape (série 3) de fermentation stabilisante d'un traitement de stabilisation selon l'invention.

En outre, les inventeurs ont observé que les cinétiques d'acidification des milieux de fermentation des étapes de fermentation stabilisante d'un traitement de stabilisation selon l'invention sont similaires à partir de la deuxième étape de fermentation stabilisante. Ces cinétiques présentent un temps de latence de l'ordre de 150 min, atteignent le pH de 6,0 entre 210 min et 250 min, le pH de 5,2 entre 290 min et 320 min et se stabilisent à un pH de l'ordre de pH 4,5 au bout de 400 min.

EXEMPLE 3 : Préparation d'un levain à partir d'un lait cru comprenant de l'ordre de $6,5 \cdot 10^3$ micro-organismes/mL.

On prélève 1 L d'un lait cru de vache présentant une numération de FMAR (Flore Mésophile Aérobie Revivifiable) faible de l'ordre de $6,5 \cdot 10^3$ micro-organismes/mL. On traite ce lait cru dans des conditions semblables à celles décrites dans l'exemple 1.

La figure 6 représente l'évolution de la composition de la flore (FMAR) mésophile aérobie revivifiable (a), de la flore coliforme (b), d'*Escherichia coli* (c), des staphylocoques (d), des levures (e), des moisissures (f) et de la flore utile (g) du milieu de fermentation au cours des étapes successives d'un traitement de stabilisation d'un lait cru ultra-propre comprenant de l'ordre de $6,5 \cdot 10^3$ micro-organismes/mL. L'analyse correspondant à la série 0 de la figure 6 (bâtonnets pleins) représente la numération du lait cru de départ. Les analyses correspondant aux séries 1, 2, 3, 4, 5 et 6 de la figure 6 représentent respectivement

les numérations du milieu de fermentation à pH 5,2 respectivement de la première, de la deuxième, de la troisième, de la quatrième, de la cinquième et de la sixième étape de fermentation stabilisante du traitement de stabilisation.

Les valeurs numériques correspondant à ces numérations sont 5 données dans le tableau 3 ci-dessous. La composition microbiologique de la flore utile (g) détaillée dans le tableau 3 regroupe l'ensemble des streptocoques (h), des lactocoques (i), des lactobacilles (j) et des leuconostoc (k). Dans le tableau 3, nd signifie non détectable.

	a	b	c	d	e	f	g			
							h	i	j	k
0	6,5E+3	6,0E+0	nd	nd	5,0E+1	2,0E+1	2,05E+3	7,5E+2	2,5E+2	1E+1
1	1,55E+9	2,46E+4	nd	nd	1,4E+5	3E+0	3,5E+8	1,53E+8	5,92E+8	1,54E+6
2	5,5E+8	7,2E+3	nd	nd	5,4E+3	1E+0	2,5E+8	7,5E+7	9,7E+7	5,3E+6
3	6,5E+8	1,45E+2	nd	nd	5,3E+1	nd	1,9E+8	2,84E+8	7,5E+7	4,3E+6
4	1,2E+9	4E+0	nd	nd	nd	nd	2,2E+8	3,4E+8	1,4E+8	2,1E+6
5	9,95E+8	nd	nd	nd	nd	nd	2,7E+8	4,5E+8	1, 2E+8	4,7E+6
6	1,1E+9	nd	nd	nd	nd	nd	3,5E+8	3,2E+8	9,8E+7	5,5E+6

10 nd = non détectable

Tableau 3

Lors de la première étape de fermentation stabilisante, la numération de la FMAR (a) passe d'une valeur initiale (série 0) dans le lait cru de $6,5 \cdot 10^3$ micro-organismes/mL, à une valeur finale dans les milieux de fermentation 15 à pH 5,2 (séries 1, 2, 3, 4, 5 et 6) successifs de l'ordre de $1,0 \cdot 10^9$ micro-organismes/mL. La numération de la flore utile (g) passe d'une valeur initiale (série 0) dans le lait cru de $3,06 \cdot 10^3$ micro-organismes/mL, à une valeur finale moyenne dans les milieux de fermentation à pH 5,2 (séries 1, 2, 3, 4, 5 et 6) successifs qui est stable et de l'ordre de $8,0 \cdot 10^8$ micro-organismes/mL.

20 En outre, la numération de la flore coliforme (b) augmente significativement d'une valeur initiale (série 0) dans le lait cru de 6 micro-organismes/mL, à une valeur dans le milieu de fermentation à pH 5,2 (série 1) de la

première étape de fermentation stabilisante de $2,46 \cdot 10^4$ micro-organismes/mL, puis décroît dans les milieux de fermentation des étapes ultérieures de fermentation stabilisante successives (séries 2, 3, et 4) jusqu'à disparaître dans les milieux de fermentation des étapes 5 et 6. Ainsi, la proportion de bactéries coliformes (b) par rapport à la FMAR passe d'une valeur de l'ordre de 0,1% dans le lait cru, à une valeur nulle dans le levain obtenu après la cinquième étape de fermentation stabilisante.

On observe également que les bactéries *Escherichia coli* (c) ainsi que les staphylocoques (d) qui ne sont pas détectables dans ce lait cru ultra-propre, ne sont pas non plus détectables dans le levain obtenu à partir de ce lait cru ultra-propre.

On observe en outre sur la figure 6 et dans le tableau 3 que les levures (e) et les moisissures (f) disparaissent totalement des milieux de fermentation successifs lors de la quatrième étape (série 4) de fermentation stabilisante d'un traitement de stabilisation selon l'invention.

REVENDICATIONS

1/ Procédé de préparation d'un levain dans lequel :

- on choisit un lait cru dans le groupe formé des laits crus dont le pH est susceptible d'atteindre, lors d'une étape, dite étape (13) de sélection, de fermentation stabilisante par fermentation lactique acidifiante du lait cru, à au moins une température, dite température de sélection, comprise entre 20°C et 42°C, une valeur de 5,5 en plus de 15 h, et une valeur minimum de 5,0 en moins de 48 h, puis,
- on réalise un traitement (15) de stabilisation de lait cru, ledit traitement comprenant au moins une étape, dite étape de fermentation stabilisante, de fermentation lactique acidifiante d'un milieu de fermentation, dont une première étape de fermentation stabilisante réalisée à partir d'un milieu de fermentation comprenant ledit lait cru, dans lequel on interrompt au moins une étape de fermentation stabilisante dudit traitement lorsque le pH du milieu de fermentation atteint une valeur comprise entre 4,6 et 6,0, en particulier une valeur de l'ordre de 5,2.

2/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la température de sélection est de l'ordre de 27°C.

3/ Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'on réalise ladite première étape de fermentation stabilisante sans ajout ni retranchement artificiel d'espèces microbiologiques au/du lait cru.

4/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'on réalise chaque étape de fermentation stabilisante à une température prédéterminée comprise entre 18°C et 35°C.

5/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'on interrompt la première étape de fermentation stabilisante après une durée de fermentation lactique acidifiante du milieu de fermentation comprise entre 12 h et 36 h.

6/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que le milieu de fermentation (16) de la première étape (17) de fermentation stabilisante est un lait cru issu de mammifère -notamment un lait cru choisi dans le

groupe formé du lait cru issu de vache, du lait cru issu de brebis, du lait cru issu de chèvre et du lait cru issu de bufflonne-.

7/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que le milieu de fermentation de la première étape de fermentation stabilisante
5 comprend des micro-organismes vivants à une concentration comprise entre $5 \cdot 10^3$ et $5 \cdot 10^5$ micro-organismes vivants/mL.

8/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'on réalise au moins deux -notamment six- étapes successives de fermentation stabilisante, chaque étape de fermentation stabilisante étant
10 interrompue.

9/ Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'on interrompt chaque étape de fermentation stabilisante par refroidissement du milieu de fermentation à une température inférieure à +4 °C.

10/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 9 caractérisé
15 en ce qu'on réalise au moins une étape, dite étape ultérieure de fermentation stabilisante, après la première étape de fermentation stabilisante, à partir d'un milieu de fermentation formé d'une quantité d'un milieu de culture liquide et d'une quantité d'un milieu de fermentation, dit milieu de fermentation précédent, obtenu à l'issue d'une étape précédente de fermentation stabilisante dans un rapport
20 volumique de la quantité de milieu de fermentation précédent sur la quantité de milieu de fermentation compris entre 0,5% et 25%, notamment compris entre 1% et 5%, en particulier de l'ordre de 2 %.

11/ Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que le milieu de culture liquide est un jus lactosé stérilisé et osmosé contenant entre 4%
25 et 20% en masse d'extrait sec, notamment 12% en masse d'extrait sec.

12/ Procédé selon l'une des revendications 10 ou 11, caractérisé en ce que le pH du milieu de culture liquide est compris entre 6,5 et 7,0.

13/ Procédé selon l'une des revendications 9 à 12, caractérisé en ce que ledit milieu de fermentation précédent présente une valeur de
30 pH comprise entre 4,6 et 6,0 et contient entre $5 \cdot 10^7$ et $5 \cdot 10^9$ micro-organismes/mL.

14/ Procédé selon l'une des revendications 1 à 13,

caractérisé en ce qu'on choisit le lait cru dans le groupe formé des laits crus dont le pH est susceptible d'atteindre, lors d'une étape, dite étape (13) de sélection, de fermentation stabilisante par fermentation lactique acidifiante du lait cru, aux températures de sélection de 27°C et de 40°C, une valeur de 5,5 en plus de 15 h, et
5 une valeur minimum de 5,0 en moins de 48 h.

15/ Levain issu de lait cru :

- comprenant plus de 10^7 micro-organismes/mL, notamment entre $5 \cdot 10^7$ et $5 \cdot 10^9$ micro-organismes/mL, et
- comprenant de 5 à 100 espèces et sous-espèces microbiologiques différentes,
10 notamment de 5 à 30 espèces et sous-espèces identifiables, en particulier de 5 à 12 espèces et sous-espèces microbiologiques, lesdites espèces et sous-espèces microbiologiques étant issues du lait cru uniquement par fermentation spontanée de celui-ci,

et dans lequel plus de 80% de ces espèces et sous-espèces microbiologiques
15 contenues dans le levain sont issues de la flore utile du lait cru.

16/ Levain selon la revendication 15, caractérisée en ce qu'il est sensiblement exempt de coliformes, d'*Escherichia coli* et de staphylocoques.

17/ Utilisation d'un levain selon l'une des revendications 15
20 et 16 pour la préparation d'une spécialité fermentée.

18/ Utilisation selon la revendication 17 d'un levain pour la préparation d'un produit laitier fermenté dans laquelle on réalise une fermentation d'un lait cru.

19/ Utilisation selon la revendication 17 d'un levain pour la
25 préparation d'un produit laitier fermenté dans laquelle on réalise une fermentation d'un lait, choisi dans le groupe formé des laits crus, des laits crus ayant subi un traitement thermique -notamment des laits pasteurisés et des laits thermisés-, des laits crus ayant subi un traitement athermique -notamment des laits micro-filtrés- des laits reconstitués et des laits standardisés.

1/5

Fig 1

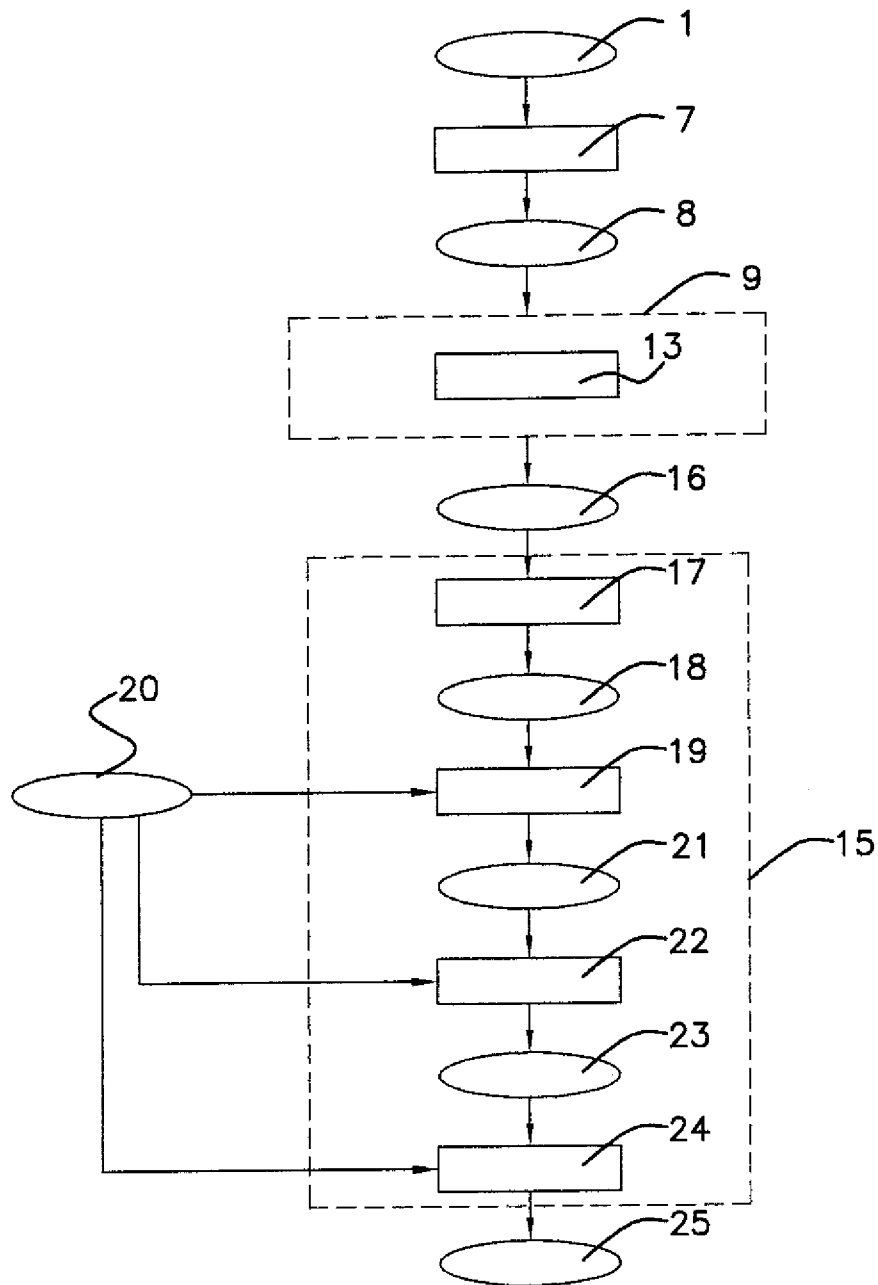


Fig 2

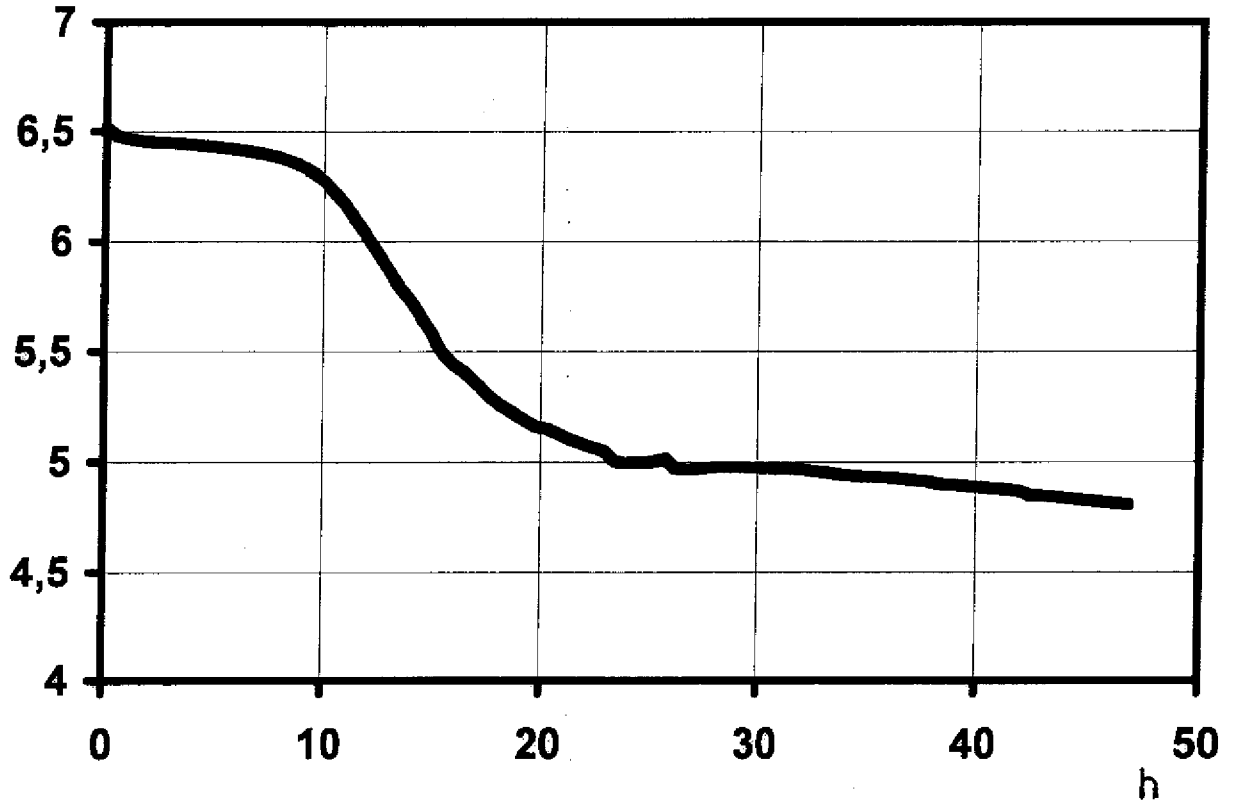
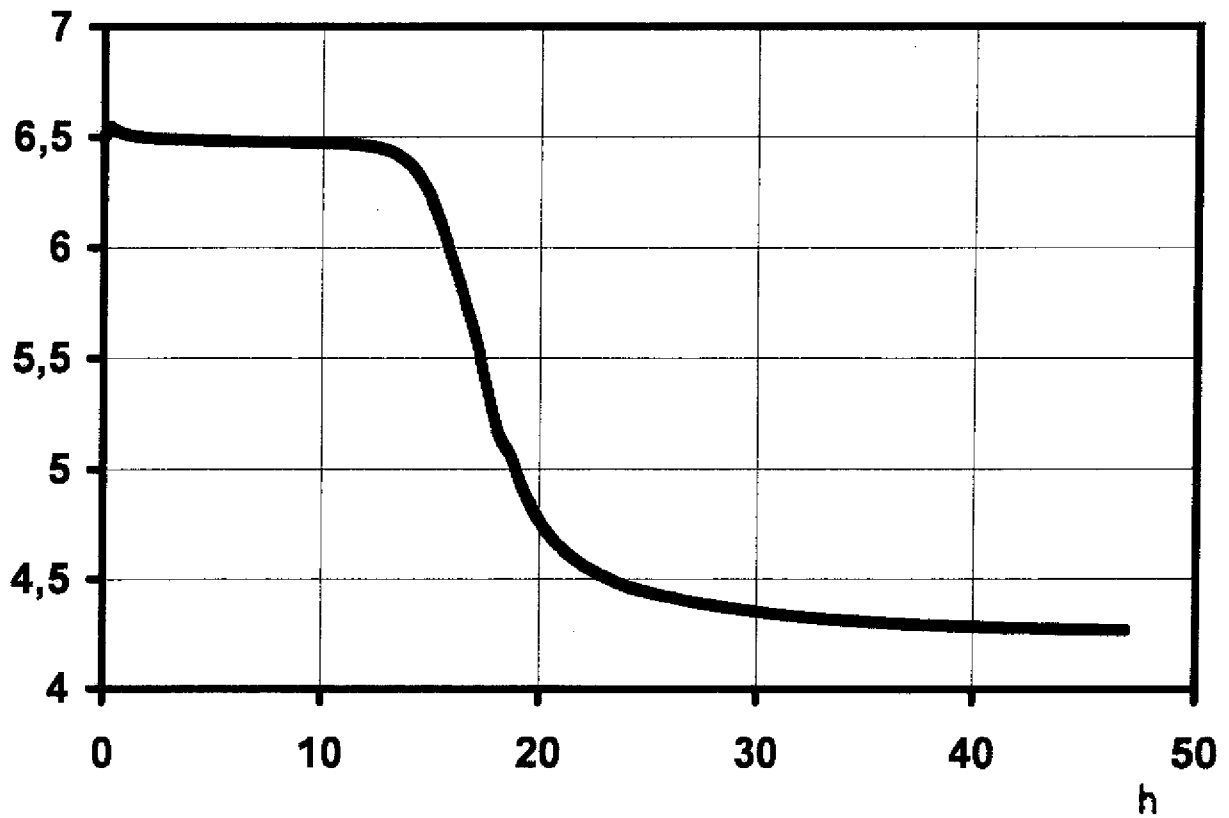


Fig 3



3/5

Fig 4

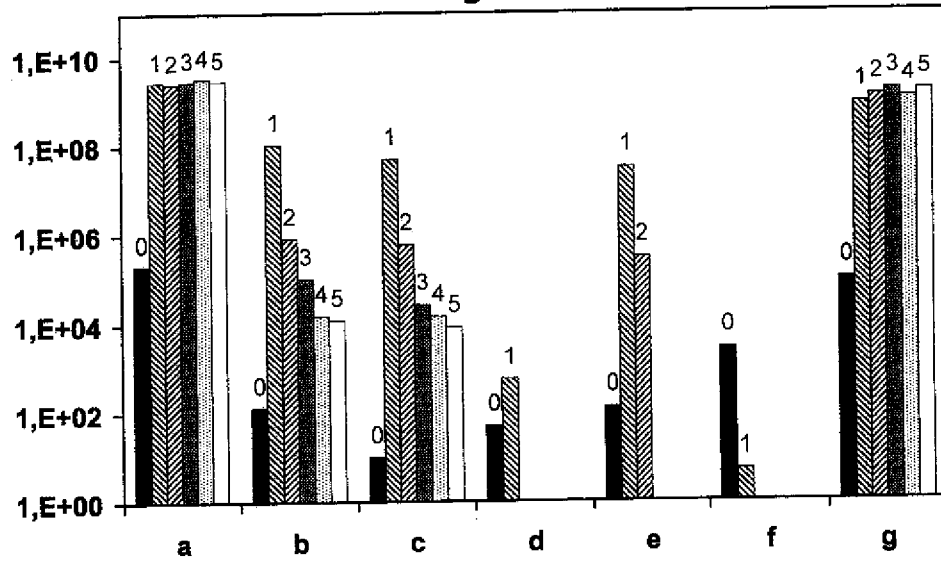


Fig 5

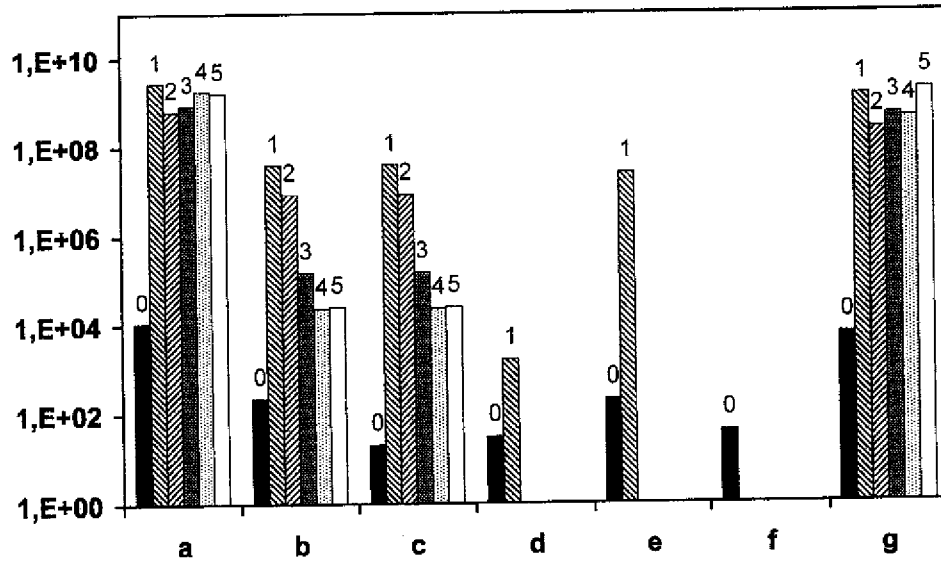
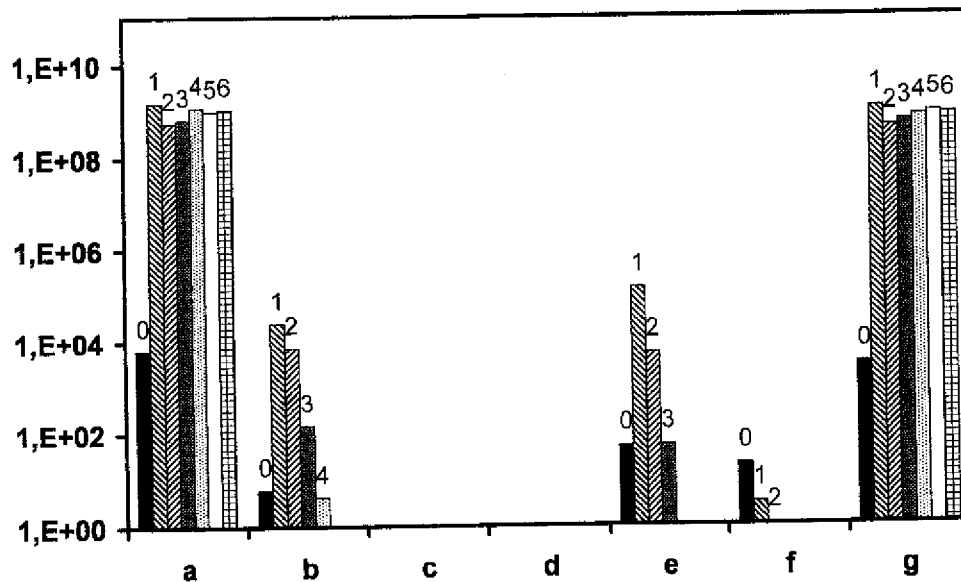


Fig 6



4/5

Fig 7

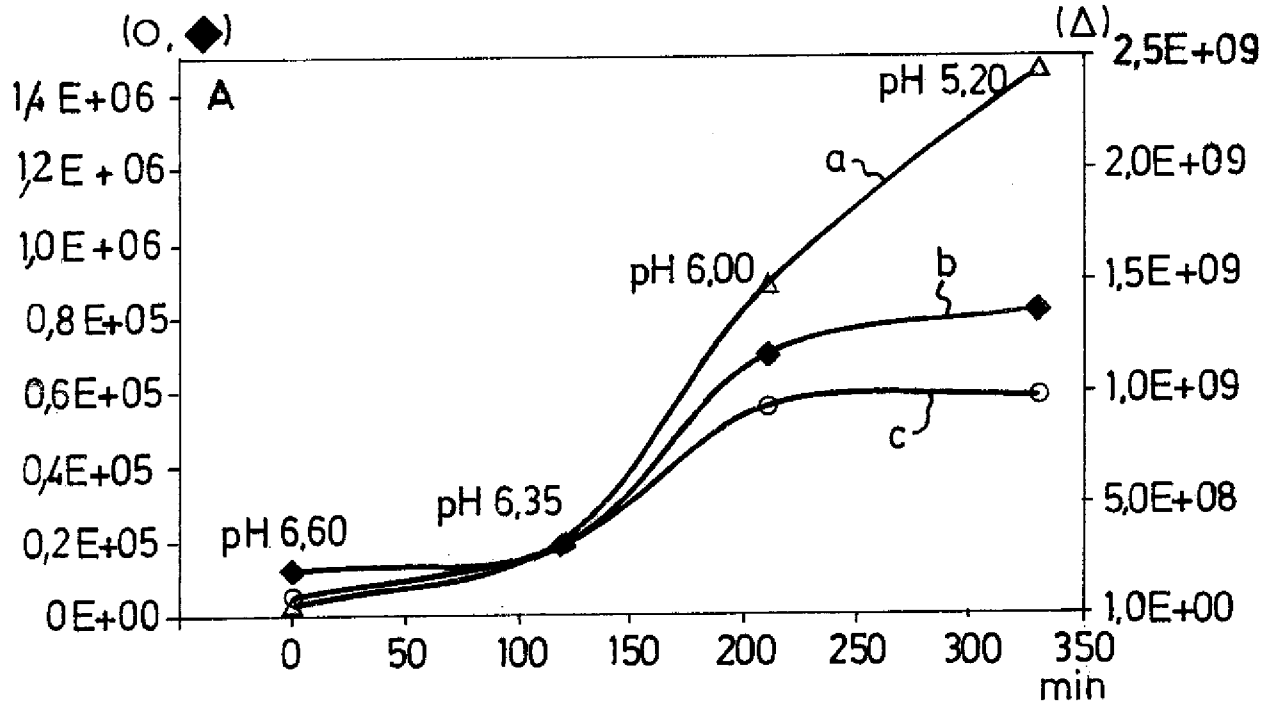


Fig 8

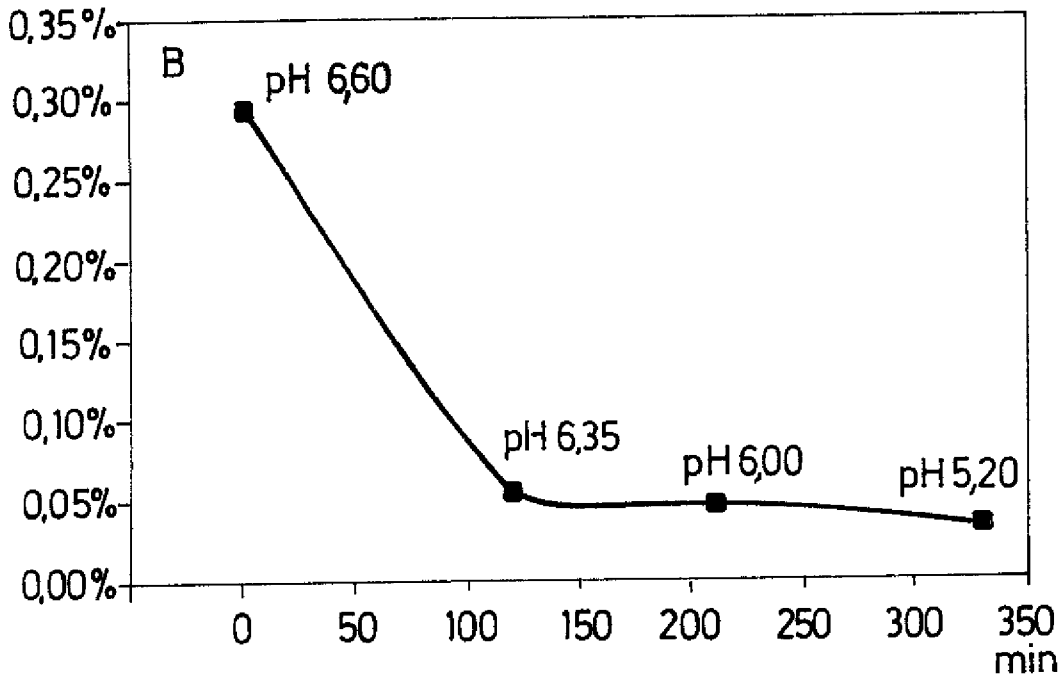


Fig 9

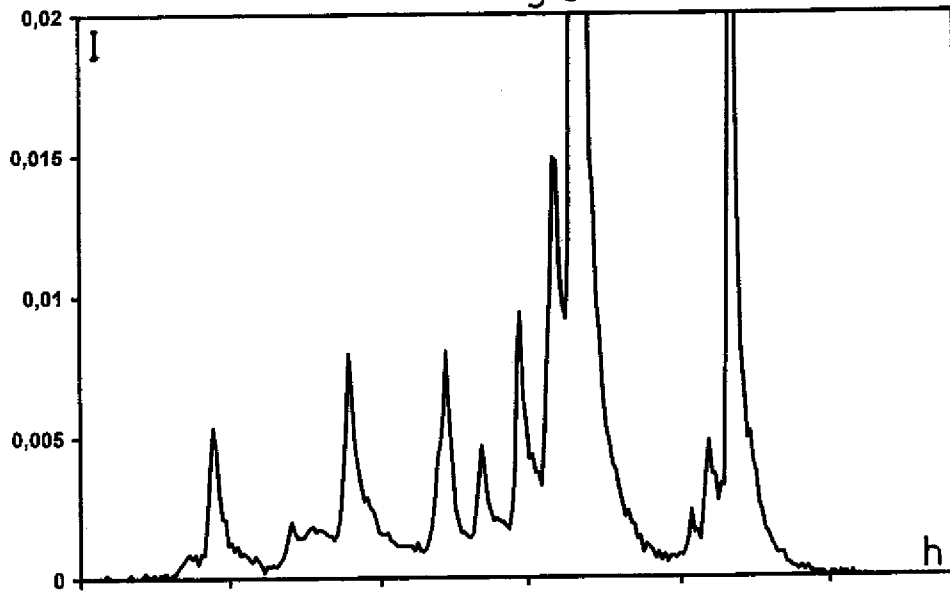


Fig 10

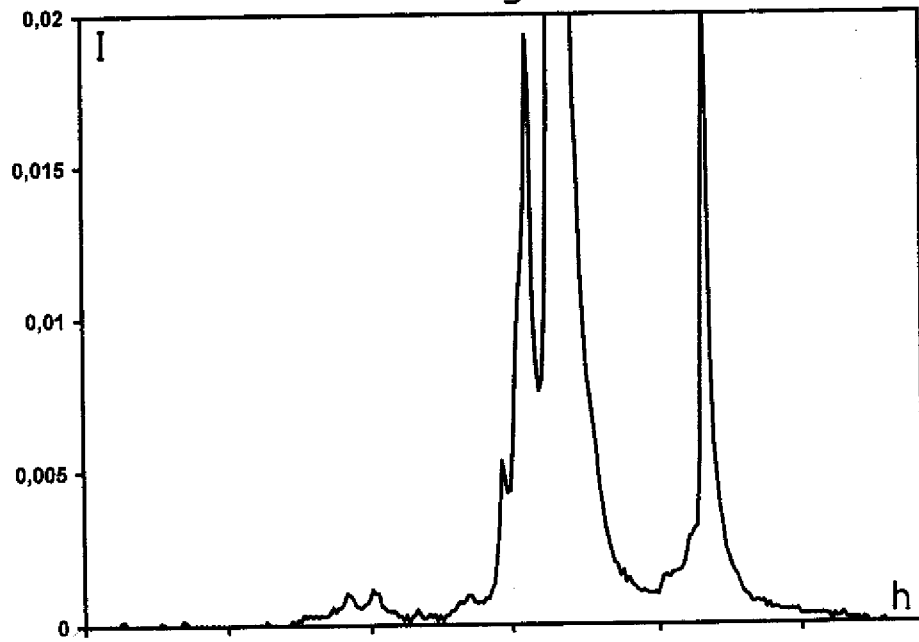
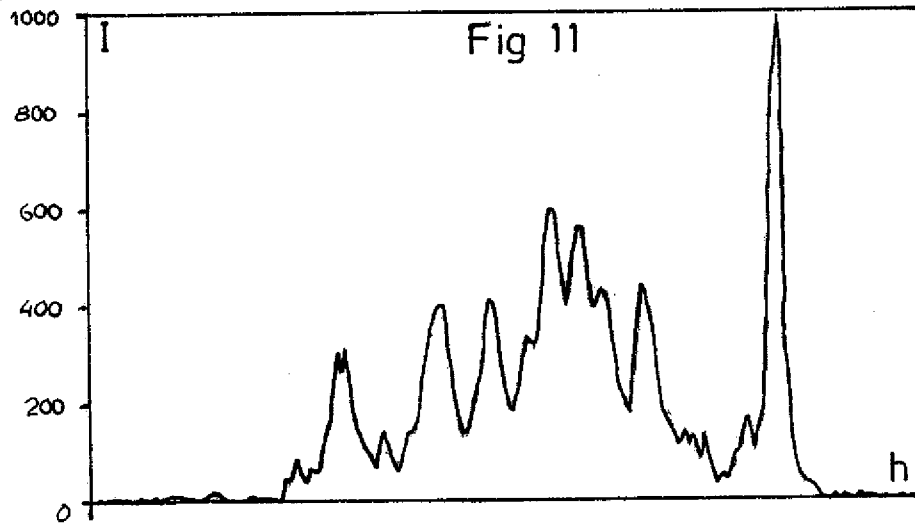


Fig 11



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2009/051314

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. A23C19/032 C12N1/20

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 C12N

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, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/110107 A (MORINAGA MILK INDUSTRY CO LTD [JP]; SHIMIZU KANETADA [JP]; KONDO SHIZU) 24 November 2005 (2005-11-24) abstract examples 1-6	1-19
X	EP 0 505 164 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD [JP]) 23 September 1992 (1992-09-23) claims 1-6 examples 1-3 page 3, lines 50-58	1-19
X	JP 2005 237238 A (ASAMA KASEI KK) 8 September 2005 (2005-09-08) abstract paragraphs [0005], [0008], [0009], [0017], [0018]	1-19
	----- -/--	



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

19 novembre 2009

Date of mailing of the international search report

02/12/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Heirbaut, Marc

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2009/051314

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WOUTERS JAN T M ET AL: "Microbes from raw milk for fermented dairy products" INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL, vol. 12, no. 2-3, 2002, pages 91-109, XP002513969 ISSN: 0958-6946 abstract page 96, column 1, last paragraph - column 2, paragraph 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-19
A	<p>PARENTE D: "Diversity and dynamics of microbial communities in natural and mixed starter cultures" AUSTRALIAN JOURNAL OF DAIRY TECHNOLOGY, vol. 61, no. 2, July 2006 (2006-07), pages 108-115, XP009111909 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-19
A	<p>BABEL F J: "Antibiosis by lactic culture bacteria." JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, vol. 60, no. 5, 1977, pages 815-821, XP002513970 PURDUE UNIV., WEST LAFAYETTE, INDIANA 47907, USA the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/FR2009/051314

Patent document cited in search report	A	Publication date	JP	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005110107	A	24-11-2005	JP	4283276 B2	24-06-2009
EP 0505164	A	23-09-1992	DE	69214987 D1	12-12-1996
			DE	69214987 T2	20-03-1997
			JP	2975148 B2	10-11-1999
			JP	4287636 A	13-10-1992
JP 2005237238	A	08-09-2005	NONE		

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2009/051314

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
 INV. A23C19/032 C12N1/20

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 C12N

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, BIOSIS, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2005/110107 A (MORINAGA MILK INDUSTRY CO LTD [JP]; SHIMIZU KANETADA [JP]; KONDO SHIZU) 24 novembre 2005 (2005-11-24) abrégé exemples 1-6	1-19
X	EP 0 505 164 A (SNOW BRAND MILK PROD CO LTD [JP]) 23 septembre 1992 (1992-09-23) revendications 1-6 exemples 1-3 page 3, ligne 50-58	1-19
X	JP 2005 237238 A (ASAMA KASEI KK) 8 septembre 2005 (2005-09-08) abrégé alinéas [0005], [0008], [0009], [0017], [0018]	1-19
	----- -/-	

 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

19 novembre 2009

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02/12/2009

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,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Heirbaut, Marc

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2009/051314

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WOUTERS JAN T M ET AL: "Microbes from raw milk for fermented dairy products" INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL, vol. 12, no. 2-3, 2002, pages 91-109, XP002513969 ISSN: 0958-6946 abrégé page 96, colonne 1, dernier alinéa - colonne 2, alinéa 1</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-19
A	<p>PARENTE D: "Diversity and dynamics of microbial communities in natural and mixed starter cultures" AUSTRALIAN JOURNAL OF DAIRY TECHNOLOGY, vol. 61, no. 2, juillet 2006 (2006-07), pages 108-115, XP009111909 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-19
A	<p>BABEL F J: "Antibiosis by lactic culture bacteria." JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, vol. 60, no. 5, 1977, pages 815-821, XP002513970 PURDUE UNIV., WEST LAFAYETTE, INDIANA 47907, USA le document en entier</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-19

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2009/051314

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2005110107 A	24-11-2005	JP 4283276 B2	24-06-2009
EP 0505164 A	23-09-1992	DE 69214987 D1	12-12-1996
		DE 69214987 T2	20-03-1997
		JP 2975148 B2	10-11-1999
		JP 4287636 A	13-10-1992
JP 2005237238 A	08-09-2005	AUCUN	