

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
—  
**INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE**  
—  
COURBEVOIE  
—

①1 N° de publication : **2 984 352**

(à n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **11 03902**

⑤1 Int Cl<sup>8</sup> : **C 12 N 1/04** (2017.01), C 12 N 11/10, 11/16, A 23 L 1/  
29, A 23 C 9/12, A 21 D 8/04, C 12 G 1/022

⑫

## BREVET D'INVENTION

**B1**

⑤4 COMPOSITION COMPRENANT UNE BIOMASSE MICROBIENNE ACTIVE.

②2 Date de dépôt : 16.12.11.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public  
de la demande : 21.06.13 Bulletin 13/25.

④5 Date de la mise à disposition du public du  
brevet d'invention : 16.02.18 Bulletin 18/07.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de  
recherche :

*Se reporter à la fin du présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux  
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦1 Demandeur(s) : *LESAFFRE ET COMPAGNIE*  
*Société anonyme — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : *LEJEUNE PASCAL JEAN DANIEL et*  
*SOUICI JEAN BERNARD.*

⑦3 Titulaire(s) : *LESAFFRE ET COMPAGNIE Société*  
*anonyme.*

⑦4 Mandataire(s) : *LESAFFRE INTERNATIONAL.*

**FR 2 984 352 - B1**



## I. INTRODUCTION : DOMAINE ET BUTS DE L'INVENTION

L'invention a trait de manière générale au domaine des  
5 compositions alimentaires comportant une biomasse microbienne,  
à un procédé pour leur préparation ainsi qu'à des activateurs de  
fermentation ou « starters », en particulier dans le domaine de la  
panification et aussi de la laiterie et/ou à des compléments  
alimentaires de type « probiotiques » comportant de telles  
10 compositions.

La présente invention concerne d'une manière générale une  
composition améliorée produite par un procédé de pulvérisation -  
encore appelé ci-après « sprayage » - d'un fort taux de biomasse  
15 microbienne, en particulier de biomasse bactérienne, sur un  
support.

Ledit support de la composition selon l'invention est notamment  
un support de type granulaire (granules ou sphérules par  
20 exemple), spécialement apte à maintenir une forte viabilité de la  
biomasse microbienne et une bonne conservation de cette  
viabilité dans le temps (préservation/persistance de la viabilité).  
Ladite composition, qui comporte des microorganismes vivants,  
en particulier des bactéries pulvérisées sur ledit support, dans les  
25 conditions habituelles d'utilisation de l'art est généralement mise  
en œuvre en tant que starter/levain sous forme de poudres  
sèches.

Le domaine technique visé dans la présente invention est en  
30 particulier celui d'une composition séchée selon un procédé  
perfectionné et adapté à la production d'une biomasse  
microbienne vivante sous forme sèche à partir d'un support de  
type granulaire apte à être enrobé de manière régulière par une

biomasse microbienne concentrée, ladite biomasse pouvant représenter de 10 à 30 % en matière sèche de la matière sèche totale du support enrobé.

- 5 Les inventeurs de la présente invention se sont particulièrement attachés à développer une composition améliorée qui renferme une biomasse qui soit stable et performante et ont mis au point un procédé de préparation spécifique de ladite composition de sorte qu'elle réponde favorablement à des critères particulièrement
- 10 discriminants et significatifs dans les domaines d'application visés et cités ci-dessus.

Les performances des compositions selon l'invention sont contrôlées par des tests spécifiques que les inventeurs ont mis au

15 point pour certains d'entre eux et utilisés au cours de leurs recherches.

Ces tests, ci-après dénommés « tests d'évaluation », sont centrés autour de la viabilité et des performances acidifiantes des compositions en particulier :

- 20 \* le test d'acidification par observation de la baisse du pH en 3 h d'un milieu à base de maltose + sels minéraux réalisée à 35°C après ensemencement d'une quantité déterminée de la composition.

- \* la détermination de la viabilité bactérienne par mesure du
- 25 nombre de colonies bactériennes se développant sur un milieu standard par étalement d'une solution contenant une quantité connue de la composition.

Le temps d'exposition à la chaleur au cours de la fabrication de la

30 composition de l'invention est aussi un paramètre qui est pris en compte.

Les inventeurs ont ensuite effectué des mesures des paramètres de conservation de ladite composition après sa production conformément au procédé de la présente invention définissant ainsi des % de préservation/persistance de la viabilité et des performances acidifiantes.

Une série de tests de conservation a ainsi été réalisée sur la composition de l'invention dans différentes conditions notamment de température, d'exposition à l'air et de durée. En particulier, des essais des performances de ladite composition sont effectués. Ce sont en particulier les tests suivants :

- sous air et sous vide à -20°C (température de stockage de référence pour ce type de produit)
- sous air et sous vide à 4°C, et
- sous air et sous vide à température ambiante (20°C).

Ont également été déterminées :

- La quantité finale de matière sèche ajoutée de type bactéries dans la composition par granule formé (MS bactéries/g de composition)  
(Rappel : cette quantité dépend du taux de sprayage)
- L'humidité finale de la composition de l'invention
- La distribution granulométrique (granulométrie laser) du support de la composition selon l'invention

## **II. ART ANTERIEUR / PROBLEMES POSES RESTANT A RESOUDRE**

- Brevet Lesaffre FR9309373
- Brevet Lesaffre EP0636692A1

Ces documents ont trait à une « Biomasse stable à base de cellules de levures et de bactéries lactiques et procédé de préparation ».

- 5 Rappels : les deux grandes techniques de conservation de biomasse bactérienne vivante sous forme sèche sont la lyophilisation et le la pulvérisation sur support.

10 La lyophilisation est une technique chère, complexe et les rendements de séchage sont parfois faibles en fonction des souches et des techniques utilisées.

La pulvérisation ou sprayage de bactéries sur support est également connu du Brevet Lesaffre EP 0 636 692 A1 mais ces techniques restent limitées quant à la quantité de biomasse que  
15 l'on peut déposer sur le support [ $< 0,5$  % MS P/P, au-delà on constate l'agglomération (mottage) de la poudre et une perte de viabilité en conservation] ce qui limite en conséquence les performances des compositions antérieures ainsi produites.

- 20 Les starters pour levains commercialisés aujourd'hui sont obtenus soit par sprayage, soit par mélange d'une grande quantité de lyophilisat et de granules de levure, soit par mélange d'une grande quantité de lyophilisat avec un support diluant et ils sont conservés en absence d'oxygène à  $-20^{\circ}\text{C}$ , pour avoir une durée  
25 de vie de 2 ans. En l'absence de ces conditions de conservation, la durée d'utilisation des starters n'excède pas 3 mois.

Les opérations de mélange, la nécessité d'une atmosphère sans oxygène, l'utilisation d'un film d'emballage étanche type  
30 « quadriplex » et le mode de conservation sont autant de paramètres qui restent encore difficiles à maîtriser, dans certains pays en particulier en ce qui concerne le respect de la chaîne du froid. Il s'en suit des problèmes de qualité sans parler des

questions de coûts industriels et environnementaux à prendre en compte.

Se pose également un autre problème qui est récurrent et est lié à la forme actuelle des starters pour levains, à savoir, celui de l'existence d'un important temps de latence lors de l'ensemencement de la farine du levain, provoquant à la fois un allongement des temps de fermentation, une variabilité de la durée du levain et un risque de développement de la flore non contrôlée de la farine.

L'ensemble de ces problèmes limite le développement de l'application des starters/levains en panification alors que leur utilisation permet la production de pains de haute qualité aromatique et nutritionnelle.

Plus récemment, la biomasse bactérienne vivante a pu aussi être utilisée en tant que probiotique, avec les problèmes liés d'une part à la nécessité d'une forte concentration en biomasse vivante et d'autre part à la survie des micro-organismes après le passage de l'estomac et de son pH fortement acide.

Les inventeurs ont par ailleurs observé que:

- les compositions de l'état de la technique présentent une hétérogénéité en raison de la présence d'agglomérats avec pour conséquence une difficulté de manipulation de ces compositions formant agglomérats
- les compositions antérieures présentent des temps de latence importants entraînant des temps de levains importants – typiquement de 16 h à 24 h – et nécessitant donc la mise en œuvre d'installations de grandes dimensions pour effectuer ces fermentations ; ces temps importants augmentent par ailleurs sensiblement le risque de développement d'une flore indésirable pouvant générer

des goûts parasites, des problèmes de panification voire le développement de bactéries pathogènes

- les compositions antérieures telle que décrites dans le brevet EP0636692A1 permettent d'atteindre, immédiatement après leur production, donc sans conservation, un pH de 5,7 en 3 h en test d'acidification, ce qui est insuffisant ; une acidification pour atteindre un pH typiquement inférieur à 5,4 après un an de conservation à 20°C est recherchée

### 10 III. PRESENTATION DE L'INVENTION

La présente invention entend résoudre les problèmes énoncés ci-dessus et surmonter les difficultés rappelées ici et rencontrées avec les compositions antérieures.

15 Les inventeurs ont montré qu'il existe en effet encore le besoin d'une composition de produits secs à base d'un support apte à être enrobé et autorisant qu'on y pulvérise une très forte concentration de bactéries vivantes, une telle composition pouvant être utilisée notamment en tant qu'activateur de fermentation / starter ou probiotique.

20 Une telle composition est améliorée en ce sens qu'elle doit permettre une protection effective des bactéries vivantes pulvérisées sur ledit support vis-à-vis en particulier d'une série de « stress » du type « stress température » - le starter étant conservé à une température positive voire à température ambiante, « stress acide » - en particulier dans l'application probiotique, il correspond à la résistance au pH gastrique - et « stress oxygène » - lors de la conservation à l'air.

30 Aussi la présente invention vient satisfaire ce besoin longtemps ressenti d'une composition présentant les qualités rappelées ci-dessus.

La présente invention a donc d'abord pour objet une composition comprenant un support apte à être enrobé de manière régulière par une biomasse microbienne, de préférence très fortement concentrée, ladite biomasse  
5 représentant des pourcentages très élevés de bactéries en matière sèche de la matière sèche totale du support enrobé.

#### **IV. RESUME DES OBJETS DE L'INVENTION, DE LEURS VARIANTES ET AVANTAGES**

10

La présente invention a donc d'abord pour objet :

- Une composition comprenant un support apte à être enrobé de manière régulière par une biomasse microbienne ladite  
15 biomasse représentant de 10 à 30 % en matière sèche de la matière sèche totale du support enrobé

D'autres caractéristiques complémentaires ou alternatives de la composition de l'invention vont maintenant être précisées :

20

- De préférence, ladite biomasse représente de 13 à 26 % en matière sèche de la matière sèche totale du support enrobé
- le support enrobé comprend avantageusement en outre une couche de protection comprenant au moins un composé  
25 choisi parmi les hydrocolloïdes, les gommes, les dextrines notamment les maltodextrines, les poly, di ou monosaccharides et leurs dérivés
- ledit support se présente de manière préférée sous la forme de granules et/ou de sphérules
- lesdites sphérules présentent de préférence un diamètre  
30 moyen  $d(0,5)$  compris entre 150 et 2000  $\mu\text{m}$ , de préférence entre 150  $\mu\text{m}$  et 1200  $\mu\text{m}$  et encore plus préférentiellement entre 150  $\mu\text{m}$  et 700  $\mu\text{m}$



- lesdites granules présentent avantageusement une longueur moyenne comprise entre 1,8 et 2,2 mm et un diamètre moyen compris entre 0,4 et 0,7 mm
- ledit support est de manière avantageuse choisi parmi les levures sèches actives et les semoules de céréales
- lesdites levures présentent de préférence un taux de matière sèche supérieur à 94 %, de préférence supérieur à 96 %, lesdites granules de levures ayant avantageusement un effet bénéfique en tant qu'absorbeur d'humidité
- lesdites semoules présentent de préférence un taux d'humidité inférieur ou égal à 8 %
- De manière avantageuse, lesdites levures sont du genre *Saccharomyces* comprenant notamment l'espèce *S. chevalieri*.
- De manière préférée, ladite biomasse microbienne comprend au moins des bactéries choisies dans le groupe constitué par des bactéries appartenant à l'un des genres suivants *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, et *Bacillus*.
- lesdites bactéries sont choisies avantageusement dans le groupe comprenant : *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus sanfrancisco*, *Lactobacillus amylovorum*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus pentosaceus*, *Lactobacillus acidilactici*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Leuconostoc oenos*, *Leuconostoc mesenteroïdes* et *Bacillus subtilis*
- le support enrobé comprend de préférence en outre une couche qui consiste en une crème de levure y pulvérisée, de préférence une crème de *S. chevalieri*, formant couche protectrice. Il est observé alors une amélioration dans la protection des bactéries lors du test de conservation sous air.

- La composition présente avantageusement un taux de mortalité bactérien inférieur ou égal à 0,5 Log U.F.C./g après une conservation d'un an à une température de 20°C sous vide et/ou après une conservation d'un an à une température de 4°C sous air.  
5
- De préférence la composition présente, après 1 an de conservation à une température positive voire à température ambiante, lors du test d'acidification sur milieu au maltose, une diminution de pH de 6,5 à au moins 5,7 après seulement 3 h.  
10
- Avantageusement, la composition selon l'invention et comportant un support qui consiste en des levures sèches actives comporte en outre au moins un additif, ou auxiliaire technologique, dit de séchage lequel est de manière avantageuse choisi dans le groupe comprenant des mono et diglycérides d'acides gras modifiés, des esters d'acides gras et de sorbitan, tel que le monostéarate de sorbitan, des esters d'acides gras et de glycérol, des esters d'acides gras et de propylène glycol, de la méthylcellulose, de la carboxyméthylcellulose, de l'hydroxypropylcellulose et/ou un mélange de ces derniers.  
15  
20

La présente invention a encore pour objet un procédé de préparation d'une composition comprenant les étapes suivantes consistant à :  
25

- i- Introduire un support apte à être enrobé dans un mélangeur traversé par un courant ascendant d'air chaud
- ii- Pulvériser une suspension de biomasse microbienne comprenant plus de 5 % en matière sèche de bactéries (P/P),  
30
- iii- Sécher par courant d'air chaud dont la température et le débit sont fixés de manière à

ce que la température de ladite composition ne dépasse pas 40°C.

- iv- Récupérer un support enrobé, et
- v- Procurer ladite composition.

5

Le mélangeur qui est mis en œuvre à l'étape (i) est avantageusement un lit d'air fluidisé (LAF) qui autorise un « sprayage » et un séchage simultanés, assurant de ce fait une protection par enrobage. Par ailleurs ce procédé favorise une  
10 meilleure conservation de la composition selon l'invention qui est plus stable au cours du temps, au regard en particulier d'une meilleure préservation de la viabilité de la biomasse, même à température ambiante.

15 Le procédé selon l'invention présente encore les caractéristiques complémentaires ou alternatives suivantes :

- de préférence, la teneur en matière sèche de bactéries pulvérisées à l'étape (ii) du procédé est comprise entre 10  
20 et 26 % et de préférence entre 13 et 26 % en matière sèche de la matière sèche totale de la composition (P/P)
- les étapes ii et iii du procédé sont de préférence simultanées
- Le procédé comporte avantageusement en outre une étape  
25 au cours de laquelle le support enrobé est revêtu par pulvérisation d'une crème de levure et/ou d'un ou plusieurs composés choisis dans le groupe constitué par des hydrocolloïdes tels que gomme arabique, gomme de caroube, gomme de guar, gellane, xanthane, alginate,  
30 cellulose ; des amidons tels que amidon natif, amidon prégélatinisé, amidons modifiés ; des dextrines telles que maltodextrines ; des mono et disaccharides tels que glucose, tréhalose, saccharose ; seuls ou en mélange.

- Ce « sursprayage » par dépôt d'une couche protectrice permet d'améliorer la conservation dans les conditions sous air et à 20°C, en particulier le « stress oxygène » subi par la composition de l'invention est fortement réduit du fait de cette protection

La présente invention a en outre pour objets :

- Un « **Activateur de fermentation** » ou « **Starter** » comportant la composition de l'invention ou telle qu'obtenue selon le procédé de l'invention, en particulier de type ferment panaire ou de type ferment de vinification ou encore de type ferment laitier et
- Un « **Probiotique** » comportant la composition de l'invention ou telle qu'obtenue selon le procédé de l'invention.

En particulier l'invention procure une composition aux propriétés d'intérêt particulièrement recherchées dans l'art.

En effet, les recherches des inventeurs ont permis la mise au point d'une composition comportant un support permettant d'augmenter d'une manière surprenante la biomasse microbienne vivante qui y est pulvérisée pour atteindre une concentration microbienne notamment bactérienne encore jamais atteinte à ce jour ladite composition restant stable au cours du temps. Les inventeurs ont également observé, de manière surprenante, une amélioration substantielle des performances acidifiantes de ladite composition par rapport aux produits équivalents existants, ainsi qu'une excellente

survie, même après 1 an de conservation à température ambiante ou en conservation sous air.

## V. DESCRIPTION DETAILLEE DE L'INVENTION

5

La présente invention va maintenant être décrite en détails dans ses autres caractéristiques et avantages au moyen d'exemples de réalisation donnés à titre purement illustratif et non limitatif et en référence aux Tableaux et Dessins annexés dans lesquels :

10

\* la Figure 1 représente les résultats d'un test d'acidification réalisé avec une composition préférée de l'invention, le SPRAY\_A, qui a été conservée 1 an à 20°C sous air et sous vide par comparaison à ceux obtenus avec une composition témoin du commerce et conservée dans les meilleures conditions, à savoir -20°C sous vide,

15

\* la Figure 2 représente les résultats d'un test d'acidification réalisé avec une composition préférée de l'invention, le SPRAY\_C dit essai de « sursprayage » qui a été conservée 1 an à 20 °C sous air et sous vide par comparaison à ceux obtenus avec un témoin du commerce et conservé dans les meilleures conditions, à savoir -20°C sous vide.

20

## VI. EXEMPLES DE REALISATION

25

### VI.1 MATERIELS ET METHODES

#### Tests d'évaluation

30

#### **A] Test acidification au maltose**

1) Matériel et réactif :

- Bécher de 250 ml
- Bain-marie avec système agitant, température de consigne à 35°C
- pHmètre à enregistreur
- 5 - Milieu Maltose + sels :

<b>Ingrédient</b>	<b>(g)</b>
eau distillée	1000
maltose, H <sub>2</sub> O	28,25
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,37
MnSO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> O	0,055

S'il n'est pas utilisé dans la journée, ce milieu doit être stérilisé

- HCl 1N

10

2) Mode opératoire milieu maltose + sels :

- Mettre le bain marie à chauffer à 35°C
- Etalonner le pH-mètre avec les tampons pH et les sondes à
- 15 température
- Mettre 150 ± 0,1g de milieu dans le bécher de 250 ml
- Introduire le bécher dans le bain-marie, placer un barreau aimanté de 25 mm, et
- Lancer l'agitation à 500 r.p.m.
- 20 - Placer l'électrode du pHmètre dans le milieu

Peser l'échantillon :

- Peser 1 g de composition ou 10 g de témoin pour 150 ml de milieu
- 25 - Démarrer le chronomètre et noter le pH initial
- Après 5 mn, ajouter l'échantillon en pluie fine en évitant la formation de grumeaux.

Attendre  $\frac{1}{2}$  h et ajouter l'HCl 1 N pour descendre le pH à  $6,20 \pm 0,05$

Enregistrer le pH pendant environ 20 heures et noter le pH à  $t=3h$

5

## **B] Test de viabilité**

### 1) Matériel :

- 10 - Milieu microbiologique : M.R.S. agar de DIFCO
- Actidione à 1,5 % stérilisée
- Solution de pourpre de bromocrésol à 4 %
- Boîtes de Pétri stériles de 90 mm
- Etuve à 30°C
- 15 - Jarres anaérobies + sachets pour anaérobiose Gen-box
- Pipettes plastiques stériles
- Etaleurs stériles

### 2) Technique :

20

- Diluer 1 g d'échantillon qsp 100 ml d'eau stérile
- Bien homogénéiser ; cette préparation est la dilution  $10^{-1}$
- Faire des dilutions successives jusqu'à  $10^{-9}$  dans des tubes d'eau stérile
- 25 - Etaler 0,1 ml en surface sur M.R.S. en boîte de Pétri avec les dilutions adéquates

### 3) Lecture :

- 30 - Incuber les boîtes de Pétri dans une jarre anaérobie, dans une étuve à 30°C pendant 24 à 72 h

- Compter le nombre de colonies apparues sur les boîtes et déterminer le nombre d'Unités Formant Colonies (U.F.C.) par mL (ou par g) en fonction de la dilution

5 **C] Mesure du pH et du T.T.A. (Acidité Totale Titrable)**

- Prélever  $10 \pm 0,1$ g de mie dans un bécher de 250 ml.
- Préparer un volume de 100 ml d'eau distillée à température ambiante.
- 10 - Ajouter environ 40 ml d'eau distillée dans le bécher et mélanger jusqu'à homogénéisation (à l'aide d'un mélangeur à haute vitesse à rotor/stator type Ultraturrax si nécessaire). Compléter avec le reste de l'eau en s'en servant pour le rinçage des instruments de mélange.
- 15 - Ajouter un barreau aimanté et placer le bécher sur une plaque agitante.
- Mesurer le pH (attendre la stabilisation du pH qui doit durer au moins une minute)
- Noter le pH.
- 20 - A l'aide d'une burette de 15 ml graduée à 0,1 ml près, verser une solution de NaOH N/10 jusqu'à  $\text{pH} = 6,6 \pm 0,1$ , attendre 5 mn, réajuster le pH jusqu'à stabilisation à  $\text{pH} 6,6 \pm 0,1$  pendant 1 minute.
- Noter le volume ajouté en ml (= T.T.A.).

25

**D] Témoin du commerce**

Témoin : Saf Levain LV1, Lesaffre International S.A.R.L. 137 rue Gabriel Péri à 59700 Marcq-en-Barœul, France.

30 Ce starter contient  $5 \times 10^9$  U.F.C. de bactéries/g de type *Lactobacillus casei*

**E] Types de supports granulaires**



- Levure Sèche Instantanée : Saf Instant, S.I.Lesaffre, 137 rue Gabriel Péri à 59700 Marcq-en-Barœul, France.
- Semoule de blé dur claire fine, biologique (Moulin des moines Meckert-Diemer S.A. 101, route de Wingersheim à 67170 Krautwiller) surséchée en séchoir à lit d'air fluidisé, par batch de 25 kg pendant 20 min dans un flux d'air de 1000 m<sup>3</sup>/h à 78°C.

## 10 F] Types de bactéries

- *Lactobacillus casei* : CNCM MA43/6V

## VI.2 EXEMPLES

15

### EXEMPLE 1 : Composition selon l'invention

#### Exemple 1.1 : Préparation d'une crème de bactéries

- La souche de bactérie *Lactobacillus casei* est propagée en fermenteur selon un procédé classique bien connu par ailleurs, employant un milieu M.R.S. pour les pré-cultures et la culture finale, tels que décrits dans « BERGEY'S Manual of systematic bacteriology – volume 2 », SNEATH, P.H.A. ; MAIR, N.S. ; SHARPE, M.E. and HOLT, J.G. (Eds), WILLIAMS AND WILKINS(Publ), 1986, Baltimore.
- On obtient en fin de fermentation des concentrations cellulaires d'environ 10<sup>10</sup> U.F.C./ml (U.F.C. = nombre de cellules pouvant se reproduire par unité, en l'occurrence par ml) ; le moût de fermentation est ensuite centrifugé pour fournir une crème de bactéries à environ 20 % de matière sèche totale et environ 1,5x10<sup>11</sup> U.F.C./ml.

30

- Cette crème est conservée au froid (4°C) en attendant d'être utilisée pour l'étape suivante. Ce temps d'attente n'excède pas quelques heures.

5 Exemple 1.2 : Préparation du support enrobé par pulvérisation selon le procédé de l'invention de la crème telle qu'obtenue à l'Exemple 1.1

- 10 • La crème de bactéries de l'étape 1 est sprayée sur le support granulaire Levure Sèche Instantanée et séchée dans un courant d'air chaud.
- 425 g de levure Saf-Instant à 95,5 % de matière sèche sont introduits dans un Lit d'Air Fluidisé Glatt GPCG1.1. L'appareil est en configuration Wurster et équipé d'une  
15 buse bi-fluide de pulvérisation de 0,8 mm en position bottom.
- 690 g de crème de bactéries à 22,0 % de matière sèche sont ainsi déposés sur le support et les paramètres de fonctionnement de l'appareil (débit et température de l'air  
20 de fluidisation, débit de la suspension de sprayage) sont choisis pour que la température du produit, à tout instant de l'opération, soit en moyenne de 39,2°C.
- La durée du sprayage et du séchage dans le Lit d'Air Fluidisé est ainsi de 124 mn.

25

Exemple 1.3 : Composition selon l'invention (support + bactéries)

- 30 • Dans les conditions décrites ci-dessus on obtient une composition finale dénommée « SPRAY\_A » à 5,3 % d'humidité et dont la teneur en bactéries est de 27,2 % matière sèche/matière sèche totale.

- Ladite composition contient initialement après séchage  $5,0 \times 10^{10}$  U.F.C. de bactéries/g.

## RESULTATS

5

**Tableau 1.a : Population bactérienne du SPRAY\_A en conservation à 20°C**

	initiale	3 mois	6 mois	12 mois
	U.F.C./g	U.F.C./g	U.F.C./g	U.F.C./g
Composition conservée sous air	5,0E+10	1,9E+10	2,8E+10	1,1E+10
Composition conservée sous vide	5,0E+10	2,5E+10	8,0E+10	5,6E+10

10 On note dans le Tableau 1.a la très faible perte de population bactérienne vivante en conservation pendant 1 an à 20°C en conservation sous air et l'absence de perte de biomasse bactérienne vivante en conservation sous vide - l'augmentation apparente de la biomasse en conservation est un artefact lié à l'incertitude de la méthode analytique utilisée.

15

Comme illustré à la Figure 1.a, on observe une meilleure acidification avec la composition « SPRAY\_A » de l'invention, même après une conservation pendant 1 an à une température de 20°C par comparaison avec le témoin commercial, conservé dans des conditions optimales (-20°C sous vide) et ceci à biomasse bactérienne mise en œuvre équivalente.

25 Comme indiqué au Tableau 1.b ces résultats sont particulièrement avantageux par comparaison avec ceux obtenus avec le Témoin (Saf Levain LV1) et ceci en condition de stress de température (conservation à 20°C) ou de stress oxydatif (conservation sous air).

**Tableau 1.b : Résultats du test d'acidification du SPRAY\_A en conservation à 20°C**

	initial	3 mois	6 mois	12 mois
	pH après 3 h	pH après 3 h	pH après 3 h	pH après 3 h
<b>10g de Témoin</b>	5,7	5,7	5,7	5,7
1g de composition conservée sous air	4,15	5,15	5,19	5,18
1g de composition conservée sous vide	4,15	4,72	4,71	4,61

5 Ils démontrent l'intérêt du sprayage d'un fort taux de bactéries selon le procédé de l'invention par rapport aux procédés connus, car il améliore la conservation de la biomasse bactérienne vivante et de son pouvoir acidifiant en condition de stress de température ou de présence d'oxygène.

10 A noter que des résultats similaires ont été obtenus avec une semoule de blé dur.

**EXEMPLE 2 :** Préparation d'une composition « sursprayée » selon la présente invention comportant un support enrobé à savoir un support et une couche superficielle de protection

15

La crème de bactéries, obtenue suivant un mode opératoire identique à celui de l'étape 1 de l'Exemple 1 est sprayée sur le support granulaire Levure Sèche Instantanée et est séchée dans un courant d'air chaud. La composition intermédiaire résultante est ensuite enrobée par une couche protectrice déposée par sursprayage d'une suspension (crème) de levures.

20

25 Etape 1 : sprayage de la crème de bactéries (composition SPRAY\_B)

La composition à sursprayer est obtenue dans les conditions suivantes :

5 935 g de crème de bactéries à 20,6 % de matières sèches sont déposés sur 600 g de support Saf-Instant. L'opération s'effectue dans un Lit d'Air Fluidisé dans les mêmes conditions qu'à l'Exemple 1.

10 On obtient une composition à sursprayer « SPRAY\_B » à 5,2 % d'humidité et dont la teneur en bactéries est de 25,2 % matière sèche/matière sèche totale.

Etape 2 : sursprayage par une crème de levures (composition SPRAY\_C)

15 500 g de la composition précédente « SPRAY\_B » sont introduits dans le Lit d'Air Fluidisé Glatt GPCG1.1, disposé en configuration Wurster et équipé d'une buse bi-fluide de pulvérisation de 0,8 mm en position bottom.

20 235 g d'une crème de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) à 24 % de matières sèches sont sursprayés sur la composition « SPRAY\_B » et les paramètres de fonctionnement de l'appareil (débit et température de l'air de fluidisation, débit de la suspension de sprayage) sont choisis pour que la température du produit, à tout instant de l'opération, soit en moyenne de 39,0°C. La durée de cette opération est de 37 minutes. On obtient finalement une composition « SPRAY\_C » protégée par une couche de levures, dont la teneur en humidité est de 4,3 % et qui contient 22,5 % de matière sèche bactéries/matière sèche totale.

25

30

## RESULTATS

**Tableau 2.a : Population bactérienne du SPRAY\_C en conservation**

	initiale	3 mois	6 mois	12 mois
	U.F.C./g	U.F.C./g	U.F.C./g	U.F.C./g
Composition conservée sous air à 4°C	1,5E+10	1,5E+10	2,1E+10	1,6E+10
Composition conservée sous vide à 20°C	1,5E+10	1,1E+10	1,4E+10	1,4E+10

On note dans le Tableau 2.a l'absence de perte significative de population bactérienne vivante en conservation pendant 1 an à 4°C en conservation sous air et l'absence de perte de biomasse bactérienne vivante en conservation à 20°C sous vide.

Comme illustré à la Figure 2, on observe une meilleure acidification avec la composition « SPRAY\_C » selon l'invention, même après une conservation pendant 1 an à une température positive (4°C) par comparaison au témoin commercial, conservé dans des conditions optimales (-20°C sous vide) et ceci à biomasse bactérienne mise en œuvre équivalente.

Comme indiqué au Tableau 2.b, ces résultats sont particulièrement avantageux par comparaison avec ceux obtenus avec le Témoin (Saf Levain LV1) et ceci soit en condition de stress de température (conservation à 20°C) ou de stress oxydatif (conservation sous air). Ces résultats démontrent l'intérêt d'un sursprayage comme protection de la biomasse d'intérêt.

**Tableau 2.b : Résultats du test d'acidification du SPRAY\_C en conservation à 4°C**

	initial	3 mois	6 mois	12 mois
	pH après 3 h	pH après 3 h	pH après 3 h	pH après 3 h
<b>10g de Témoin</b>	5,7	5,7	5,7	5,7
1g de composition conservée sous air	4,78	5,19	5,56	5,33
1g de composition conservée sous vide	4,78	5,09	5,58	5,31

5

### EXEMPLE 3 : APPLICATIONS

#### 10 FERMENT PANAIRE

Fabrication d'un pain au levain à partir de la composition conforme à l'invention et décrite à l'Exemple 1.

15 On réalise 2 essais de panification suivant la formule et le procédé décrit ci-après.

Essai 1 : pain au levain fabriqué avec le témoin Saf Levain LV1 à 3 mois de conservation sous vide à -20°C.

20 Essai 2 : pain au levain fabriqué avec la composition de l'Exemple 1 à 1 an de conservation sous vide à 20°C (température ambiante).

#### 1) Fabrication des levains :

Formule	Essai 1 : levain 1	Essai 2 : levain 2
Ingrédients	% de la farine mise en œuvre	% de la farine mise en œuvre
Farine de blé T55	100	100
Eau	54	54
Sel	1,5	1,5

Saf Levain LV1	0,5	
Composition suivant l'Exemple 1		0,05

Ces 2 pâtes, ci-après dénommées « levain » sont laissées à fermenter pendant 20 h à 30°C.

5 2) Fabrication des pains :

Composition de la pâte finale

	Essai 1 : pâte 1	Essai 2 : pâte 2
	% de la farine mise en œuvre	% de la farine mise en œuvre
Farine de blé T55	100	100
eau	64	64
Sel	1,8	1,8
Levain 1	30	
Levain 2		30
Levure pressée Hironnelle bleue Lesaffre	0,2	0,2

Schéma de fabrication

**pétrissage Artofex**

vitesse lente (40 r.p.m.)	2 mn
vitesse rapide (60 r.p.m.)	13 mn
température pâte	26°C

**pointage**

temps	160 mn
température	ambiante
humidité	ambiante

**pesage**

poids	500 g
temps	10 mn

**détente**

temps	20 mn
température	ambiante



humidité	ambiante
----------	----------

**apprêt**

temps	3 h
température	ambiante
humidité	ambiante

**cuisson four à sole**

temps	45 mn
température	225°C
humidité	Buée : 1+1

## 3) Résultats :

	Volume spécifique	pH de la mie	T.T.A. de la mie	Appréciation organoleptique
	cm <sup>3</sup> /g		ml (10 g)	
	cm <sup>3</sup> /g		ml (10g)	
Essai 1	4.1	4.4	3.4	+++
Essai 2	3.9	4.3	4	+++

5 Ces résultats, jugés similaires tant au niveau analytique qu'au niveau de la dégustation, montrent l'intérêt de la composition de l'Exemple 1 par rapport à un témoin du commerce. En effet, bien que conservée pendant un an à température ambiante et ajoutée à une dose 10 fois moindre par rapport au témoin (essai 1), la composition de l'Exemple 1, conforme à

10 l'invention, produit un pain aux caractéristiques similaires à celles d'un starter du commerce conservé seulement 3 mois dans des conditions optimales (-20°C sous vide).

## REVENDEICATIONS

1. Composition comprenant une levure sèche active enrobée de manière régulière par une biomasse bactérienne constituée de bactéries appartenant au genre *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* et/ou *Bacillus*, ladite biomasse représentant de 10 à 30 % en matière sèche de la matière sèche totale de la levure enrobée (P/P).  
5
2. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite biomasse représente de 13 à 26 % en matière sèche de la matière sèche totale de la levure enrobée.  
10
3. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 2, caractérisée en ce que la levure enrobée comprend en outre une couche superficielle de protection comprenant au moins un composé choisi parmi les hydrocolloïdes, les gommes, la dextrine, les poly, di ou monosaccharides et leurs dérivés.  
15
4. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que ladite levure se présente sous la forme de granules et/ou de sphérules.
- 20 5. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que lesdites sphérules présentent un diamètre moyen  $d(0,5)$  compris entre 150  $\mu\text{m}$  et 2000  $\mu\text{m}$ , de préférence entre 150  $\mu\text{m}$  et 1200  $\mu\text{m}$  et encore plus préférentiellement entre 150  $\mu\text{m}$  et 700  $\mu\text{m}$ .
- 25 6. Composition selon la revendication 4, caractérisée en ce que lesdits granules présentent une longueur moyenne comprise entre 1,8 et 2,2 mm et un diamètre moyen compris entre 0,4 et 0,7 mm.
- 30 7. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la levure comporte un additif ou auxiliaire de fabrication choisi dans le groupe constitué par les mono et diglycérides d'acides gras modifiés, des esters d'acides gras et de sorbitan, tel que le monostéarate de sorbitan, des esters d'acides gras et de glycérol, des esters d'acides gras et de propylène glycol, de la méthylcellulose, de la

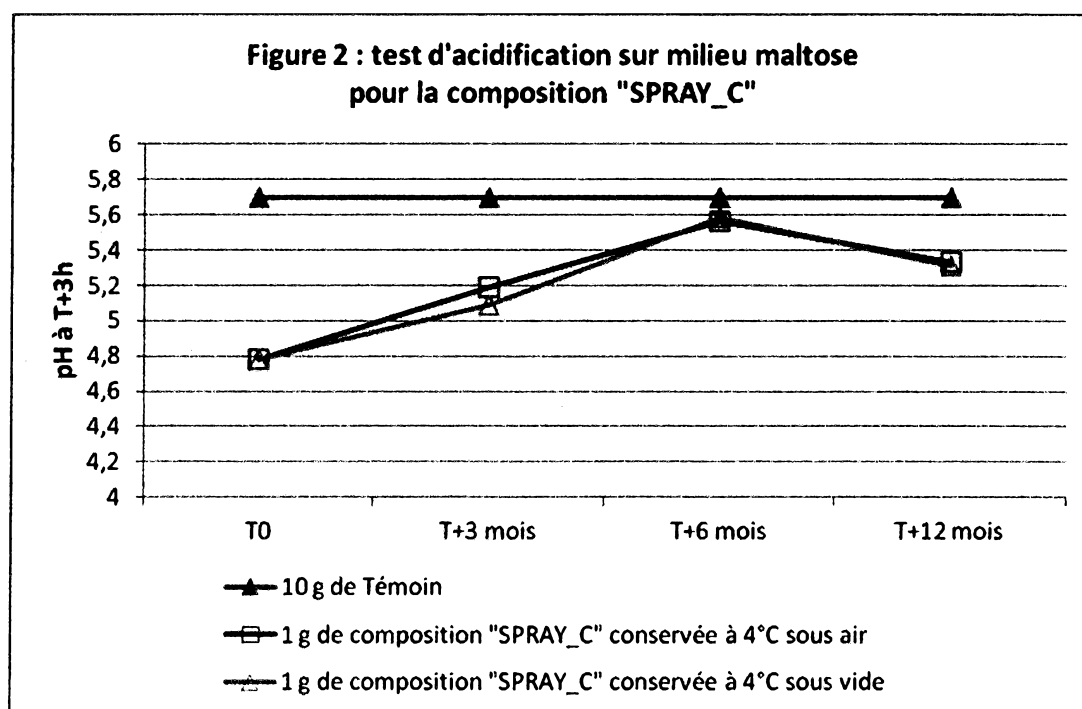
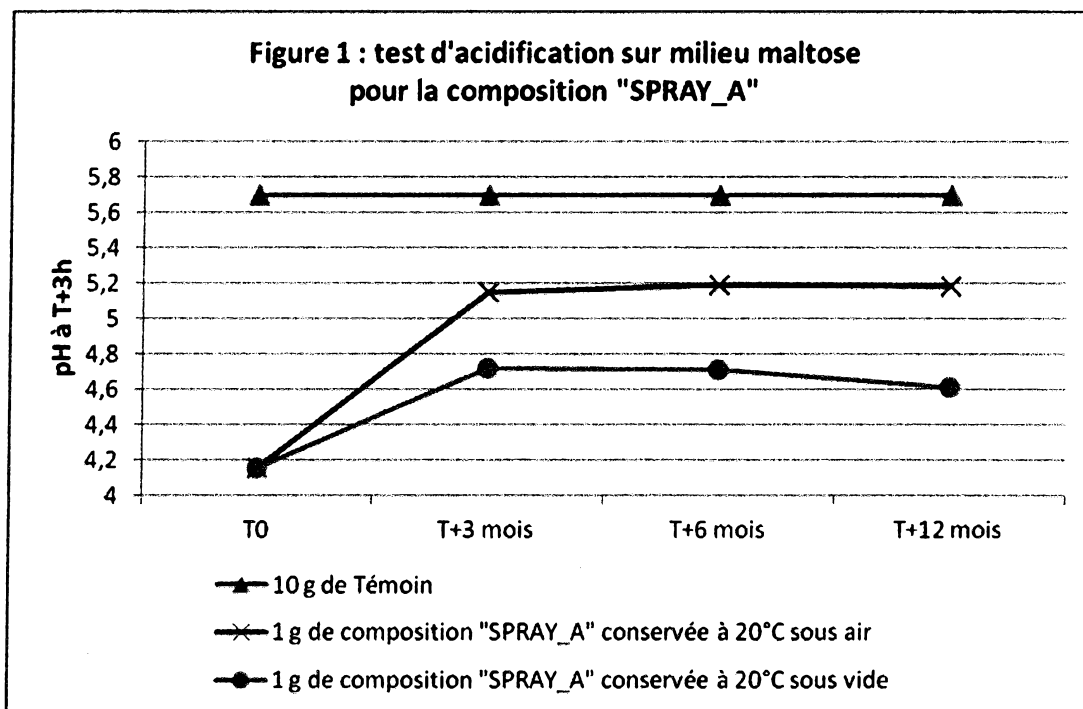
carboxyméthylcellulose, de l'hydroxypropylcellulose et/ou un mélange de ces derniers.

8. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la levure présente un taux de matières sèches actives supérieur à 94 %, de préférence supérieur à 96 %.
9. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la levure est du genre *Saccharomyces* comprenant notamment l'espèce *Saccharomyces chevalieri*.
10. Composition selon la revendication 1, caractérisée en ce que les bactéries sont choisies dans le groupe comprenant les espèces : *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus sanfrancisco*, *Lactobacillus amylovorum*, *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus pentosaceus*, *Lactobacillus acidilactici*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Leuconostoc oenos*, *Leuconostoc mesenteroides* et *Bacillus subtilis*.
11. Composition selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la levure enrobée comprend en outre une couche protectrice qui consiste en une crème de levures, de préférence une crème de *S. chevalieri*.
12. Composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 11, caractérisée en ce qu'elle présente un taux de mortalité bactérien inférieur ou égal à 0,5 Log U.F.C./g après une conservation d'un an à une température de 20 °C sous vide et/ou après une conservation d'un an à une température de 4 °C sous air.
13. Composition selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisée en ce qu'elle présente après une conservation sous vide de 1 an à une température de 20°C, lors du test d'acidification sur milieu au maltose, une diminution de pH de 6,5 à 5,7 après 3h.
14. Procédé de préparation d'une composition selon l'une des revendications 1 à 13 comprenant les étapes suivantes consistant à :
  - i- introduire une levure apte à être enrobée dans un mélangeur traversé par un courant ascendant d'air chaud,

- ii- pulvériser une suspension de biomasse bactérienne comprenant plus de 5 % en matière sèche de bactéries, ladite biomasse bactérienne étant constituée de bactéries appartenant au genre *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*,  
5 *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* et/ou *Bacillus*,
- iii- sécher par courant d'air chaud dont la température et le débit sont fixés de manière à ce que la température de ladite biomasse ne dépasse pas 40°C, les étapes (ii) et (iii) étant simultanées,
- iv- récupérer la levure apte à être enrobée, et  
10 v- procurer ladite composition.
15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que la teneur en bactéries est comprise entre 10 et 26 % en matière sèche et de préférence entre 13 et 26 % en matière sèche de la matière sèche totale de la composition (P/P).
- 15 16. Procédé selon la revendication 14 ou 15, caractérisé en ce qu'il comporte en outre une étape au cours de laquelle la levure est enrobée par pulvérisation d'une crème de levures et/ou d'un composé choisi dans le groupe constitué par des hydrocolloïdes tels que gomme arabique, gomme de caroube, gomme de guar, gellane, xanthane, alginate, cellulose ; des  
20 amidons tels que amidon natif, amidon pré-gélatinisé, amidons modifiés ; des dextrans telles que maltodextrines ; des mono et disaccharides tels que glucose, tréhalose, saccharose ; seuls ou en mélange.
17. Activateur de fermentation de type Starter comportant une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 ou telle qu'obtenue à  
25 partir d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 16.
18. Probiotique comportant une composition selon l'une quelconque des revendications 1 à 13 ou telle qu'obtenue à partir d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 14 à 16.
19. Activateur selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il représente un  
30 ferment panaire.
20. Activateur selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il représente un ferment de vinification.

21. Activateur selon la revendication 17, caractérisé en ce qu'il représente un ferment laitier.

I/I



# RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

## OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

---

L'I.N.P.I. annexe à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention, au sens des articles L. 611-11 (nouveau) et L. 611-14 (activité inventive) du code de la propriété intellectuelle. Ce rapport porte sur les revendications du brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

## CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

---

- Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- Le demandeur a maintenu les revendications.
- Le demandeur a modifié les revendications.
- Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

## DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

---

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

**1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION**

EP 0 636 692 A1 (LESAFFRE & CIE [FR])  
1 février 1995 (1995-02-01)

EP 0 159 891 A1 (MORINAGA MILK INDUSTRY CO LTD [JP])  
30 octobre 1985 (1985-10-30)

WO 2011/004375 A1 (RUBIN ISRAEL [IL]; ZIMAND HENRI [MC]; SASON DORON [IL]; PENHASI ADEL [I])  
13 janvier 2011 (2011-01-13)

EP 1 514 553 A1 (CHUNG MYUNG-JUN [KR])  
16 mars 2005 (2005-03-16)

**2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL**

WO 01/68808 A1 (LALLEMAND S A [FR]; DURAND HENRI [FR]; PANES JEROME [FR])  
20 septembre 2001 (2001-09-20)

**3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES**

NEANT