



SPF ECONOMIE, P.M.E.,

CLASSES MOYENNES & ENERGIE

NUMERO DE PUBLICATION : 1015158A4

NUMERO DE DEPOT : 2002/0610

Classif. Internat. : A23C A23L

Date de délivrance le : 05 Octobre 2004

**Le Ministre de l'Economie,**

Vu la Convention de Paris du 20 Mars 1883 pour la Protection de la propriété intellectuelle;

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 24 Octobre 2002 à 15H00 à l'Office de la Propriété Intellectuelle

**ARRETE :**

ARTICLE 1.- Il est délivré à : LAITERIE TRIBALLAT  
rue Julien Neveu 2, BP 93106, F-35531 NOYAL SUR VILAINE(FRANCE)

représenté(e)(s) par : VAN MALDEREN Eric, OFFICE VAN MALDEREN, Place Reine Fabiola  
6/1 - B 1083 BRUXELLES.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : PROCEDE DE FABRICATION DE PRODUITS FERMENTES A BASE DE SOJA, PRODUITS FERMENTES OBTENUS PAR CE PROCEDE ET FERMENTS CORRESPONDANTS.

INVENTEUR(S) : Gilioli Mirco, via Rolando da Corniano, I-42021 Bibbinao (RE) (IT)

PRIORITE(S) 25.10.01 FR FRA 0113836

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeurs(s).

Pour expédition certifiée conforme

Bruxelles, le 05 Octobre 2004  
PAR DELEGATION SPECIALE :

BAILLEUX G.  
Conseiller adjoint

BAILLEUX G.  
Conseiller adjoint

**Procédé de fabrication de produits fermentés à base de soja, produits fermentés obtenus par ce procédé et ferments correspondants.**

L'invention concerne le domaine de la conception et de la réalisation des produits alimentaires obtenus par fermentation d'une matière première à base de soja.

Principalement, l'invention s'applique au domaine de la fermentation du jus obtenu par le pressurage des graines de soja et communément connu de l'homme de l'art français sous le terme « tonyu ».

L'invention trouve toutefois aussi son application dans le domaine de la fermentation de produits similaires au « tonyu » obtenus par dissolution directe dans l'eau de protéines de soja, telles quelles ou mélangées à d'autres ingrédients ou obtenues en utilisant des farines de soja.

De tels produits similaires au « tonyu » présentent des caractéristiques organoleptiques et nutritionnelles inférieures à celui-ci.

On notera que dans le cadre de la fabrication du tonyu, on utilise des graines sèches qui sont réhydratées avec de l'eau, le pourcentage de graines de soja utilisé par rapport à l'eau étant d'environ 10%.

Une fois réhydratées, les graines sont moulues et le jus est extrait à partir de ces graines moulues. Ce jus est également improprement appelé « lait de soja » (on notera toutefois que l'appellation anglaise "soy milk" est autorisée dans des pays comme la Grande-Bretagne et les Etats-Unis).

Les produits alimentaires à base de tonju ou de produit similaire fermenté connaissent un grand succès depuis de nombreuses années. Ces produits constituent en effet des desserts riches en protéines pouvant se substituer aux desserts lactés fermentés tels que les yaourts ou les fromages blancs.

Le succès de ce type de produit tient notamment à l'origine végétale du produit de base, le soja, servant à les fabriquer.

Toutefois, les ferments classiquement utilisés pour fermenter ce type de produit sont les ferments lactiques utilisés pour la fermentation des produits laitiers.

Un objectif de la présente invention est de proposer un nouveau procédé de fabrication de produits alimentaires à base de jus de soja ("tonyu"), ou à base

de tout autre produit similaire, mettant en œuvre un ferment autre que les ferments lactiques classiquement utilisés dans ce cadre.

Il existe en effet un besoin chez certains consommateurs de disposer de produits présentant une origine à plus forte connotation végétale.

5           Encore un autre objectif de la présente invention est de proposer un tel procédé permettant d'obtenir un produit alimentaire présentant des qualités diététiques améliorées et permettant notamment de lutter contre l'hypercholestérolémie et les pathologies associées.

10           En effet, le cholestérol pouvant être à l'origine de pathologies graves du système circulatoire, il existe un besoin grandissant pour des produits probiotiques pouvant être utilisés dans la prévention des pathologies liées à la consommation d'aliments riches en cholestérol.

15           Ces différents objectifs, ainsi que d'autres qui apparaîtront par la suite, sont atteints grâce à l'invention qui concerne l'utilisation d'une souche particulière de *Lactobacillus plantarum* enregistrée à la Collection Nationale de Cultures de Micro organismes (CNCM) de l'Institut Pasteur de Paris sous le numéro d'ordre I-2641 pour la fermentation de jus de soja ("tonyu") et/ou de tout autre produit similaire à base de soja.

20           La souche de *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641 (nommée par la Déposante *Lactobacillum plantarum* "MV3 SOJASUN") a été isolée à l'origine à partir de plants de tomates et offre donc l'avantage de présenter une origine végétale.

25           De plus, comme il sera expliqué ci-après plus en détail, des tests ont montré que cette souche présente l'avantage d'avoir une activité "cholestérolophage", c'est-à-dire permettant de dégrader, in situ, le cholestérol.

30           La souche de *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641 pourra notamment être mise en œuvre dans tout procédé de fabrication d'un produit obtenu par fermentation de jus de soja ("tonyu") et/ou de tout autre produit similaire à base de soja, ledit procédé comprenant :

- au moins une étape d'inoculation dudit jus de soja et/ou dudit produit similaire avec au moins un ferment incluant *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641 ;

- au moins une étape de fermentation.

On pourra choisir d'utiliser dans le cadre d'un tel procédé la souche de *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641 seule.

Toutefois, selon une variante de mise en œuvre de la présente invention, on pourra aussi choisir d'utiliser un ferment incluant *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641 et au moins une autre souche choisie parmi le groupe constitué par : *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*. Ces trois dernières souches sont classiquement utilisées pour la fermentation des produits lactés et des produits à base de soja.

Selon une variante intéressante, ledit ferment comprend un mélange de *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641 et de *Lactobacillus acidophilus*. Un tel mélange présente l'avantage de favoriser le développement, pendant la fermentation, de substances aromatiques dotant le produit final d'excellentes qualités organoleptiques.

La température et la durée de l'étape de fermentation pourront varier en fonction du produit à fermenter.

Selon une étape préférentielle, ladite étape de fermentation est effectuée à une température et pendant une durée choisies pour obtenir un produit final présentant un pH d'environ 4,5.

Avantageusement ladite température est comprise entre environ 20°C et environ 44°C. Préférentiellement, la température de fermentation est d'environ 37°C.

Egalement avantageusement, ladite durée de fermentation ("temps de maturation") est comprise entre 9 et 14 heures. Préférentiellement cette durée est d'environ 12 à 13 heures.

On notera que ce temps de maturation est beaucoup plus long que pour les ferments lactiques classiques.

Selon une variante préférée de l'invention, le procédé de fabrication selon l'invention comprend une étape préliminaire de pasteurisation ou de stérilisation du jus de soja et/ou du produit similaire à base de soja.

D'une façon préférée entre toutes, le procédé comprend les étapes suivantes postérieures à ladite étape de fermentation

- une étape de rupture de coagulation ;
- une étape de lissage ;

- une étape éventuelle de mélange avec d'autres ingrédients tels que par exemple des morceaux de fruits ou de la purée de fruit.

Selon une variante, le procédé peut aussi comprendre une étape de refroidissement avant l'étape de lissage ou après l'étape de mélange avec d'autres ingrédients.

L'invention concerne également tout aliment obtenu par fermentation de jus de soja et/ou de tout autre produit similaire à base de soja grâce à un ferment incluant *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641.

L'invention couvre également tout ferment destiné à la fermentation de jus de soja ou de tout autre produit à base de soja caractérisé en ce qu'il inclut *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641.

L'invention, ainsi que les différents avantages qu'elle présente, seront plus facilement compris grâce à la description qui va suivre d'un mode de réalisation de celle-ci, donné à titre purement indicatif et donc non limitatif.

La souche de *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641 peut être conservée dans l'azote liquide à -196°C sur milieu MRS liquide (DIFCO).

La morphologie de la souche a été observée au microscope optique à contraste de phase ainsi qu'au microscope électronique. La morphologie de cette souche est typique de l'espèce *Lactobacillus plantarum*. Le profil de fermentation des sucres a été déterminé grâce au système API 50CHL (BIOMERIEUX France). La lecture des résultats a été effectuée après 48 h d'incubation de la galerie API à 37°C dans des conditions d'anaérobiose.

La figure 1 représente les résultats obtenus. On notera qu'après 72 h d'incubation à 37°C la souche a montré la capacité de fermenter le mélibiose et le tréhalose mais s'est montrée incapable de fermenter l'arabinose.

D'autres tests ont montré que la souche produisait durant la fermentation de l'acide lactique à 64,3% dextrogyre et à 37,5°C levogyre.

D'autres tests ont été effectués sur la mobilité électrophorétique de l'enzyme PEP-X de la souche de *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641.

L'analyse a été effectuée pour confirmer la position taxonomique de la souche.

L'enzyme a été extraite mécaniquement par ultra sons des cellules.

La fraction cytoplasmique contenant l'enzyme a été soumise à une séparation sur gel de polyacrylamide dans des conditions non dénaturantes.

La figure 2 montre la mobilité électrophorétique de l'enzyme PEP-X des souches *Lactobacillus casei* ATCC393 (1), *Lactobacillus paracasei* ATCC334 (2), *Lactobacillus plantarum* CNBL1001 (3-4) et *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641 (5-6).

La résistance de la souche *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641 à divers antibiotiques a également été testée grâce à la méthode de diffusion de pastilles et l'évaluation quantitative selon KIRBY-BAUER. Les résultats sont donnés en figure 3.

La souche *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641 a par ailleurs fait l'objet d'une évaluation de ses caractéristiques génétiques. L'analyse de l'ADN plasmidial de la souche a été effectuée grâce à la méthode décrite par ANDERSEN et Mc KAY. La figure 4 met en évidence le profil de l'ADN plasmidial de la souche et la figure 5 propose une comparaison des profils des ADN plasmidiaux de diverses souches de lactobacilles de différentes espèces : *Lactobacillus plantarum* MV3 (2), *Lactobacillus casei* AT4 (3), *Lactobacillus saké* L2S (4), *Lactobacillus curvatus* M3S (5), *Lactobacillus casei* TOV34 (6) (1 : marqueur).

Le profil de l'ADN génomique de la souche de *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641 a été obtenu grâce à la digestion enzymatique de l'ADN chromosomal avec l'enzyme *Sfi* I selon FERERO et AL. On a utilisé comme marqueur  $\lambda$ LADDER PFGE. La figure 6 montre le profil de l'ADN chromosomal de la souche venant d'être isolée (A), et d'une souche conservée depuis 5 ans (D), (C) étant le profil du marqueur.

La capacité de *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641 à dégrader le cholestérol a été vérifiée *in vitro*. En présence pendant 24 h et à 37°C d'un milieu contenant 1% de cholestérol, les cellules ont été séparées du surnageant par centrifugation et la quantité de cholestérol a été dosée selon la méthode de GELLILAND et AL. La souche a montré une capacité à absorber 82% du cholestérol.

Dans le cadre d'un mode de réalisation, on aensemencé du jus de soja ("tonyu") avec un ferment constitué à 50% de *Lactobacillus plantarum* CNCM I-

2641 et à 50% de *Lactobacillus acidophilus*. Le produitensemencé a été placé dans une étuve à 37°C pendant 12 h.

Il a ensuite été malaxé à l'aide d'un agitateur pour permettre la rupture du caillé (rupture de coagulation). Le produit a ensuite subi une étape de lissage.

5 Cette étape peut être effectuée en utilisant un filtre spécifique ou une vanne de lissage ou d'autres moyens mécaniques adaptés.

Le mode de réalisation de l'invention ici décrit n'a nullement pour objet de réduire la portée de celle-ci pour en conséquence il pourra y être apporté les nombreuses modifications sans sortir de son cadre.

## REVENDICATIONS

- 5 1. Utilisation de *Lactobacillus Plantarum* enregistrée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur sous le numéro d'enregistrement I-2641 pour la fermentation de jus de soja et/ou de tout autre produit similaire à base de soja.
2. Procédé de fabrication d'un produit obtenu par fermentation de tonyu et/ou de tout  
10 autre produit similaire à base de soja, ledit procédé comprenant :
- au moins une étape d'inoculation dudit jus de soja et/ou dudit produit similaire avec au moins un ferment incluant *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641
  - au moins une étape de fermentation.
3. Procédé selon la revendication 2 caractérisé en ce que ledit ferment inclut  
15 *Lactobacillus plantarum* et au moins une autre souche choisie parmi le groupe constitué par : *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricum*.
4. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce que ledit ferment comprend un mélange de *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641 et de *Lactobacillus acidophilus*.
- 20 5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 2 à 4 caractérisé en ce que ladite étape de fermentation est effectuée à une température et pendant une durée choisies pour obtenir un produit final présentant un pH d'environ 4,5.
6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que ladite température est d'environ 20°C à 44°C.
- 25 7. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que ladite température est d'environ 37°C.
8. Procédé selon l'une des revendications 5 à 7 caractérisé en ce que ladite durée de fermentation est comprise entre 9 et 14 heures.
9. Procédé selon la revendication 8 caractérisée en ce que ladite durée de  
30 fermentation est d'environ 12 à 13 heures.
10. Procédé selon l'une quelconque des revendication 2 à 9 caractérisé en ce qu'il comprend une étape préliminaire de pasteurisation ou de stérilisation du jus de soja et/ou du produit similaire à base de soja.



**11.** Procédé selon la revendication 10 caractérisée en ce qu'il comprend les étapes suivantes postérieures à ladite étape de fermentation :

- une étape de rupture de coagulation ;
- une étape de lissage ;

5       - une étape éventuelle de mélange avec d'autres ingrédients tels que par exemple des morceaux de fruits ou de la purée de fruit.

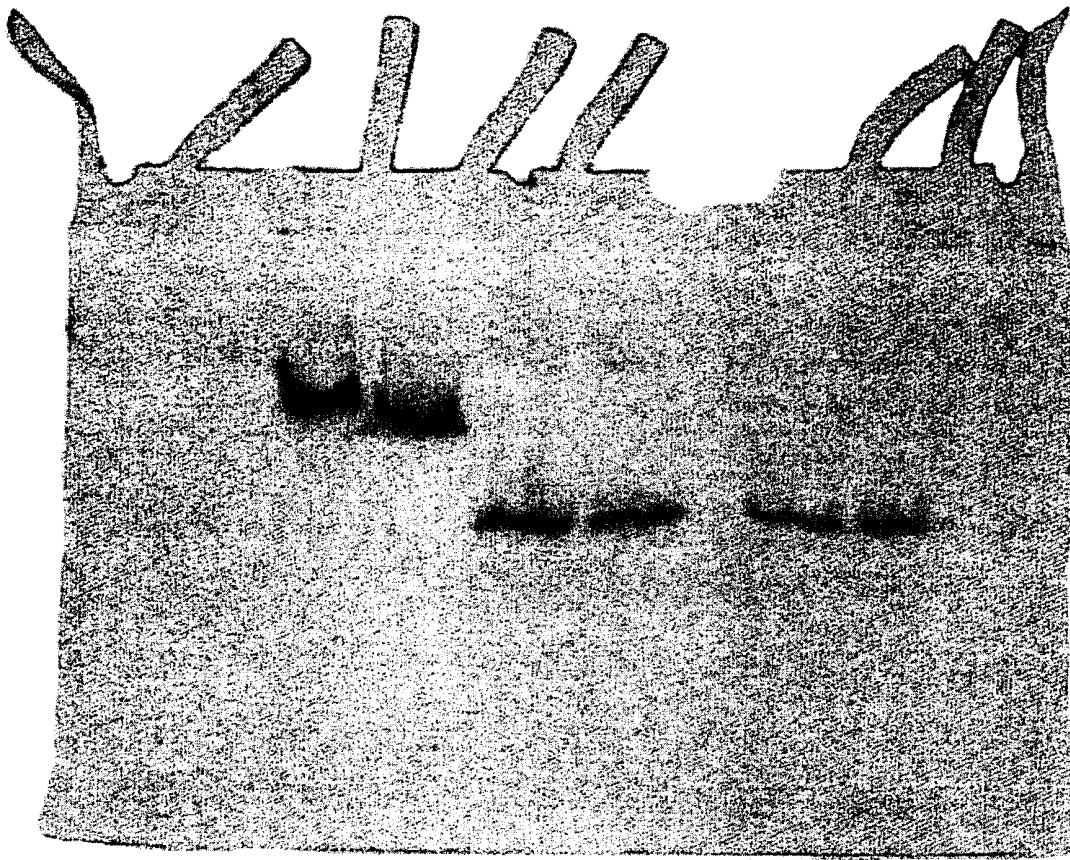
**12.** Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce qu'il comprend une étape de refroidissement avant l'étape de lissage ou après l'étape de mélange avec d'autres ingrédients.

10   **13.** Aliment obtenu par fermentation de tonju ou de tout autre produit similaire à base de soja caractérisé grâce à un ferment incluant *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641.

**14.** Ferment destiné à la fermentation de jus de soja ou de tout autre produit à base de soja caractérisé en ce qu'il inclut *Lactobacillus plantarum* CNCM I-2641.

SUCRES	24 <sup>h</sup>	48 <sup>h</sup>
Glycérol	-	-
Erythrol	-	-
D-arabinose	-	-
L-arabinose	-	-
Ribose	+	+
D-xylose	-	-
L-xylose	-	-
Adonitol	-	-
$\beta$ -méthylxyloside	-	-
Galactose	+	+
D-glucose	+	+
D-fructose	+	+
D-mannose	+	+
L-sorbose	-	-
Rammose	-	-
Dulcitol	-	-
Inositol	-	-
Mannitol	+	+
Sorbitol	-	±
$\alpha$ -méthyl-D-mannoside	-	-
$\alpha$ -méthyl-D-glucoside	-	±
N-acétylglucosamide	+	+
Amigdaline	+	+
Arbutine	+	+
Esculine	+	+
Salicine	+	+
Cellobiose	+	+
Maltose	-	±
Lactose	±	±
Melibiose	-	-
Saccharose	+	+
Trehalose	+	+
Inuline	-	+
Melezitose	+	+
D-raffinose	-	-
Amidose	-	-
Glycogène	-	-
Xilitolose	-	-
$\beta$ -gentibiose	±	±
D-turanose	-	+
D-lixose	-	-
D-tagatose	+	+
D-fucose	-	-
L-fucose	-	-
D-arabinitol	-	-
L-arabinitol	-	-
Gluconate	-	±
2-chetogluconate	-	-
5-chetogluconate	-	-

Figure 1 -



- 1 = *Lactobacillus casei* ATCC 393
- 2 = *Lactobacillus paracasei* ATCC 334
- 3-4 = *Lactobacillus plantarum* CNBL 1001
- 5-6 = *Lactobacillus plantarum* MV 3

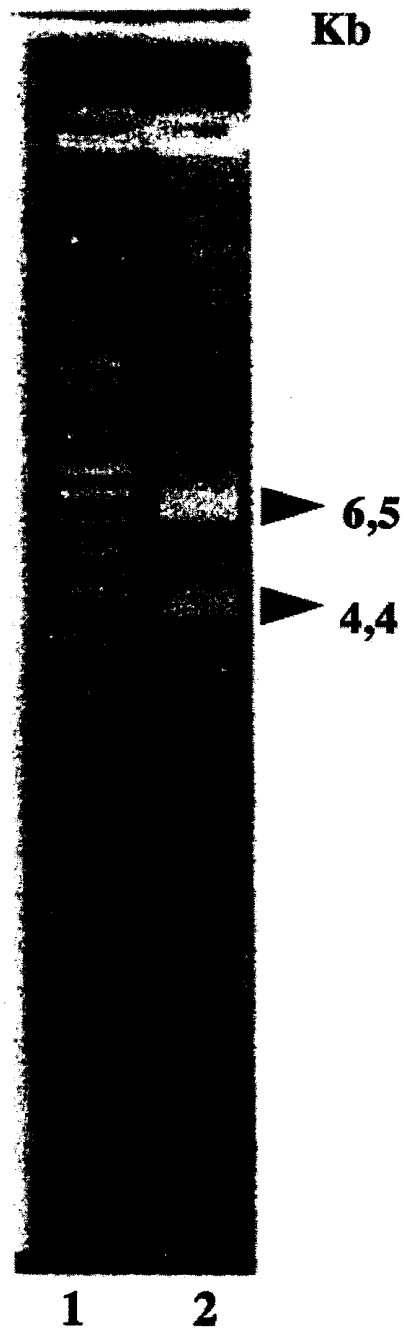
Figure 2

Antibiotique	Dose (U.I.)	Diamètre (mm)	Sensibilité
<b>β - Lactamines</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>R</b>
Pénicilline G	10	20	S
Ampicilline	5	17	S
Cloxacilline	30	0	R
Cefaloridine			
<b>Aminosides</b>			
Streptomycine	10	0	R
Neomycine	30	0	R
Kanamycine	30	0	R
Gentamycine	10	0	R
<b>Tetracyclines</b>			
Tetracycline	30	20	S
Oxitetra-cycline	30	22	S
<b>Macrolides</b>			
Spiramicine	100	15	S
Lincomicine	2	0	R
<b>Phéricole</b>			
Chloramphéricole	30	21	S
<b>Riframicine</b>			
Riframicine	30	23	S
<b>Divers</b>			
Noviobicine	20	12	S
Vancomicine	30	0	R
<b>Polypeptide</b>			
Colistine	10	0	R
Bacitracine	10	0	R

**S = sensible**

**R = résistant**

**Figure 3.-**

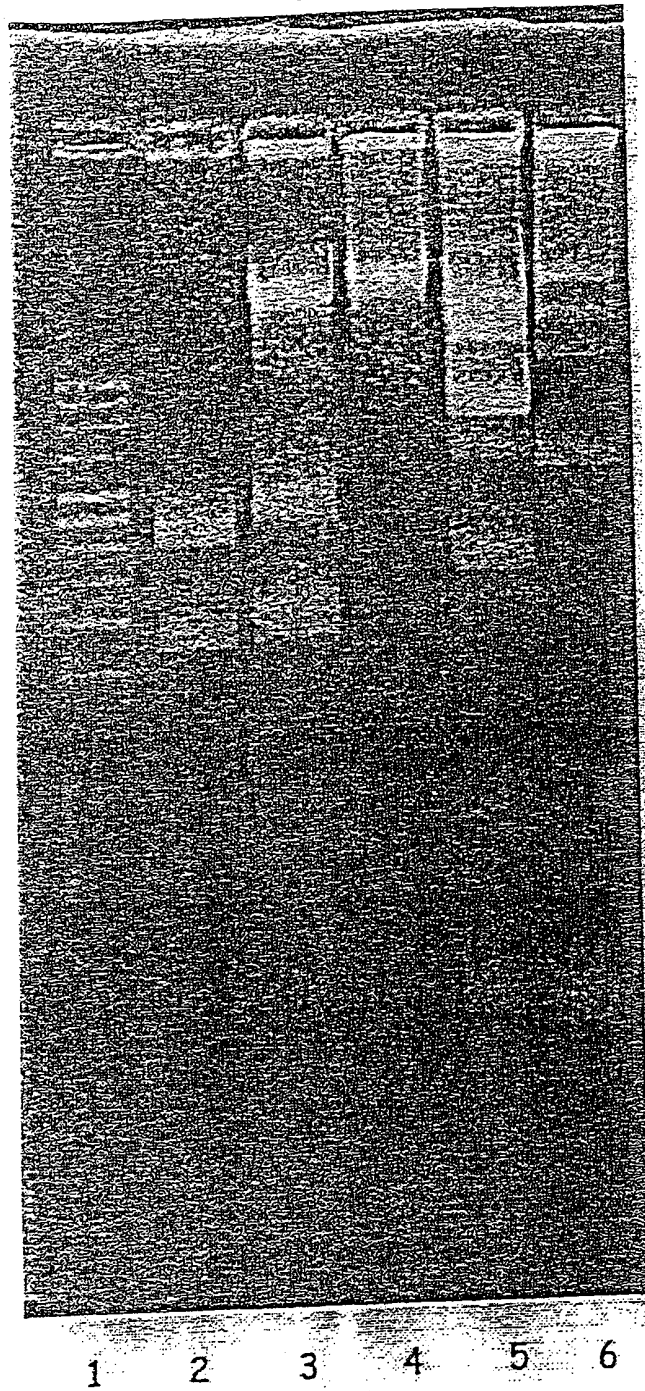


1 = marqueur "Supercoiled DNA Ladder" (GIBCO-BRL)  
2 = ADN plasmidial de *Lactobacillus plantarum* MV3

Figure 4

2002/0610.

13

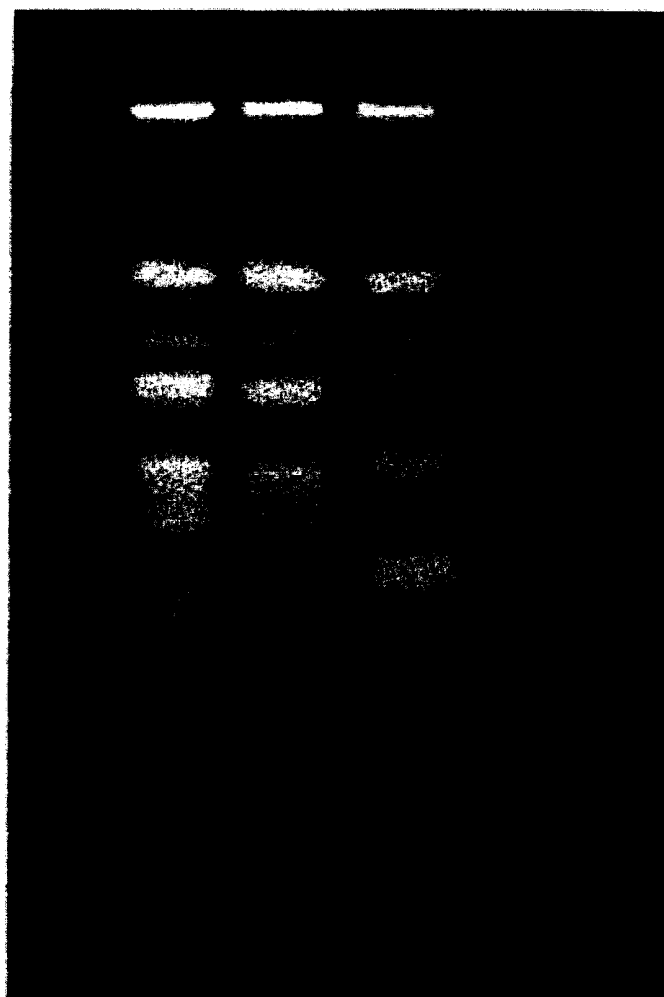


- |                                    |       |
|------------------------------------|-------|
| 1 = marqueur                       |       |
| 2 = <i>Lactobacillus plantarum</i> | MV 3  |
| 3 = <i>Lactobacillus casei</i>     | AT4   |
| 4 = <i>Lactobacillus sake</i>      | L2S   |
| 5 = <i>Lactobacillus curvatus</i>  | L3S   |
| 6 = <i>Lactobacillus casei</i>     | TOV34 |

Figure 5.

2002/0610.

14



**A B C**

Figure 6

**ABREGE**

**Procédé de fabrication de produits fermentés à base de soja, produits fermentés obtenus par ce procédé et ferments correspondants.**

5

L'invention concerne l'utilisation de *Lactobacillus Plantarum* enregistrée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes de l'Institut Pasteur sous le numéro d'enregistrement I-2641 pour la fermentation de jus de soja ("tonyu") et/ou de tout autre produit similaire à base de soja.

10





**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement  
national

FA 611386  
FR 0113836

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
A	<p>DATABASE FSTA 'en ligne! INTERNATIONAL FOOD INFORMATION SERVICE (IFIS), FRANFURT/MAIN, DE; ROSSI E A ET AL: "Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties." Database accession no. 2000-00-j0532 XP002205126 * abrégé * &amp; EUROPEAN FOOD RESEARCH AND TECHNOLOGY 209 (5) 305-307 1999 DEP. DE ALIMENTOS E NUTR., FAC. DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, RODOVIA ARARAQUARA-JAU, KM 1, CAMPUS UNIVERSITARIO, ARARAQUARA-SP, CEP 14801-902, BRAZIL,</p>		
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
9 juillet 2002		Desmedt, G	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>	

X

1  
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

/14 (5/13 FSTA) - (C) FSTA / IFIS

XP-002205126

A23011/10B2

pd -  
P I ①

AN - 2000-00-j0532 FSTA

DT - J Journal

TFT - J - Fruits, vegetables and nuts

TI - Development of a novel fermented soymilk product with potential probiotic properties.

AU - Rossi E A; Vendramini R C; Carlos I Z; Pei Y C; Valdez G F de

PUB - European Food Research and Technology

- 209 (5) 305-307

- 1999

- Dep. de Alimentos e Nutr., Fac. de Ciencias Farmaceuticas, Rodovia Araraquara-Jau, Km 1, Campus Universitario, Araraquara-SP, CEP 14801-902, Brazil

IRN - ISSN 1438-2377

LA - En

IW - BACTERIA; BEVERAGES; CHOLESTEROL; NOVEL FOODS; PHYSICAL PROPERTIES; SENSORY PROPERTIES; SOY PRODUCTS

- CHOLESTEROL; LACTIC ACID BACTERIA; PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES; PROBIOTIC FOODS; SENSORY PROPERTIES; SOYMILK

AB - Ability of *Enterococcus faecium* [CRL 183], *Lactobacillus acidophilus* [CRL 1014], *L. jugurti* [416], *Streptococcus thermophilus* [85] and *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* [73] to decrease cholesterol in vitro and to grow in the presence of bile salts was investigated. Both properties were dependent on the species under study. The cultures were also inoculated into soymilk fortified with dry milk whey powder as single or mixed starters. Physicochemical and sensory evaluations of the fermented products showed that *E. faecium* plus *L. jugurti* (ratio 1:1) is the best combination, and this mixture also produced a 43% decrease in cholesterol.