



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 112013025640-0 B1



(22) Data do Depósito: 09/04/2012

(45) Data de Concessão: 10/09/2019

(54) Título: LACTOBACILLUS RHAMNOSUS MELHORADORES DE SABOR

(51) Int.Cl.: A23C 9/123; A23C 19/032.

(30) Prioridade Unionista: 08/04/2011 EP 11161665.2.

(73) Titular(es): CHR. HANSEN A/S.

(72) Inventor(es): LUCIANA JIMENEZ; GUNNAR OEREGAARD; JEORGOS TRIHAAS; GAELLE LETTIER BUCHHORN; DITTE MARIE BRANDT; DITTE MARIE FOLKENBERG; BIRGITTE VEDEL THAGE.

(86) Pedido PCT: PCT EP2012056386 de 09/04/2012

(87) Publicação PCT: WO 2012/136832 de 11/10/2012

(85) Data do Início da Fase Nacional: 04/10/2013

(57) Resumo: RESUMO Patente de Invenção: "LACTOBACILLUS RHAMNOSUS MELHORADORES DE SABOR". A presente invenção refere-se a uma composição adequada para a preparação de um produto de laticínio compreendendo pelo menos uma cultura de início e uma cepa de Lactobacillus rhamnosus capaz de conferir sobre o produto de laticínio um sabor cremoso melhorado sem afetar de forma negativa reologia do produto de laticínio. A presente invenção ainda se refere à processos para a preparação de produtos de laticínio, tais como um iogurte ou queijo de baixo teor de gordura que tenha um teor elevado de diacetil. Uma cepa do Lactobacillus rhamnosus útil para a preparação de tais produtos de laticínio também faz parte da presente invenção.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**LACTOBACILLUS RHAMNOSUS MELHORADORES DE SABOR**".

**CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se a uma composição adequada para a preparação de um produto de laticínio compreendendo pelo menos uma cultura de início e uma cepa de *Lactobacillus rhamnosus* capaz de conferir sobre o produto de laticínio um sabor cremoso melhorado sem afetar de forma negativa reologia do produto de laticínio. A presente invenção ainda se refere a processos para a preparação de produtos de laticínio, tais como um iogurte ou queijo de baixo teor de gordura que tenha um teor elevado de diacetil. Uma cepa do *Lactobacillus rhamnosus* útil para a preparação de tais produtos de laticínio também faz parte da presente invenção.

**Antecedente da Técnica**

Na indústria de produtos de laticínio com um conteúdo baixo ou nenhum conteúdo de gordura está sendo experimentada uma crescente demanda a partir dos consumidores.

No entanto, esses produtos de laticínio de baixo teor de gordura quase sempre experimentam uma falta de um sabor cremoso.

O diacetil é um produto de alto valor e é usado na indústria de laticínios como um composto que produz um sabor amanteigado adicionado a tais produtos como as margarinhas e produtos com base em óleo.

As bactérias do ácido heteroláctico formam a diacetil/acetoína como um produto secundário junto com o lactato como o produto principal. As células formas acetaldeído ativo a partir do piruvirato e do pirofosfato de tiamina através da piruvirato oxidase. O acetaldeído ativo se condensa com outra molécula de piruvirato e forma alfa-acetolactato sintase. A formação de diacetil no *Lactobacillus rhamnosus* não está bem entendida – na *Lactobacillus lactis* subsp., *lactis* biovar. *Dacetilactis* tem sido sugerido que o alfa acetolactato é oxidado para diacetil através de um alfa acetolactato oxidase (Jyoti et al, 2003). A acetoína é formada diretamente através de descarboxilação do alfa acetolactato. A formação da acetoína também pode ocorrer através de irreversível diacetil redutase do diacetil em acetoína.

O *Lactobacillus rhamnosus* é uma bactéria do ácido heteroláctico que pode ser usada para produzir compostos de sabor como o diacetil e a acetoína (Jyoti et al., 2003). O nível de diacetil produzido depende da cepa bem como do substrato sobre o qual ela é cultivada.

5 A Patente US 4.867.990 e a Patente US 5.236.833 se referem a processos para a produção de diacetil através da fermentação de um substrato de café e um substrato de pectina, respectivamente, em uma bactéria produtora de ácido láctico.

10 A preparação, concentração e adição do diacetil e/ou da acetoína em produtos de alimentação estão ligadas a custos substanciais.

A US 4.678.673 é direcionada a produtos oleaginosos fermentados com a cepa *Lactobacillus rhamnosus* que produz diacetil e acetoína. Os produtos oleaginosos fermentados tem um sabor semelhante a amanteigado ou de laticínio. Não há menção do uso do *Lactobacillus rhamnosus* em produtos de laticínio.

15 Por esse motivo, existe uma necessidade com relação a um processo para a preparação de produtos de laticínio com um sabor cremoso melhorado sem a adição dispendiosa de diacetil e/ou de acetoína.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

20 É um objetivo da presente invenção o de prover uma composição e um método para a preparação de um produto de laticínio melhorado com um sabor cremoso acentuado conferido através da presença de uma cepa do *Lactobacillus rhamnosus*.

25 É outro objetivo da presente invenção o de prover uma ce- pa do *Lactobacillus rhamnosus* com propriedades aperfeiçoadas com rela- ção a serem capazes de dar um sabor cremoso acentuado a um produto de laticínio, tal como um iogurte ou um queijo.

30 Objetivos adicionais se tornarão aparentes a seguir, aqui, neste pedido de patente, e ainda outros se tornarão óbvios para uma pessoa ver- sada na técnica a qual a invenção diz respeito.

Como pode ser observado nos exemplos de trabalho aqui, neste pedido de patente, a cepa do *Lactobacillus rhamnosus* descrita CHCC12697

que foi depositada com a German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) sob o número de acesso de DSM2466 produz diacetil e acetoina dando, por meio disso um sabor cremoso acentuado a um produto de laticínio, sem afetar de forma significativa a reologia e a pós-acidificação do

5 produto de laticínio.

Em consequência, um primeiro aspecto da presente invenção se refere a uma composição para a preparação de um produto de laticínio que compreende, pelo menos uma cultura de partida e uma cepa do *Lactobacillus rhamnosus*.

10 Em uma modalidade de muita preferência, a cepa do *Lactobacillus rhamnosus* é uma *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 que foi depositada com a German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) sob o número de acesso de DSM2466 ou uma cepa mutante da mesma, em que a cepa mutante é obtida através da utilização da cepa depositada como

15 o material de partida.

Um segundo aspecto da presente invenção de refere o uso de uma composição de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção para a preparação de um produto de laticínio.

20 Um terceiro aspecto da presente invenção está direcionado a um método para a produção de um produto de laticínio, o método compreendendo as etapas de:

(a) inoculando um substrato de leite com a composição de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção;

(b) fermentando o substrato de leite;

25 (c) opcionalmente adicionando outros micro-organismos e/ou aditivos ao substrato de leite;

(d) opcionalmente pós tratando o substrato de leite; e

(e) opcionalmente embalando o produto de laticínio.

Um quarto aspecto da invenção se refere a um produto de laticínio que pode ser obtido através do método de acordo com o terceiro aspecto da invenção.

Um quinto aspecto da presente invenção se refere à cepa

CHCC12697 do *Lactobacillus rhamnosus*, que foi depositada com a German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) sob o número de acesso de DSM2466 ou uma cepa mutante da mesma, em que a cepa mutante é obtida com a utilização da cepa depositada como o material de partida.

#### DESCRÍÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

A Figura 1 mostra o tempo de fermentação para o iogurte (tempo para chegar ao pH 4,55). Foram feitos iogurtes com uma cultura de bactérias do acido láctico que continha múltiplas cepas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* que continham 0% de cepa CHCC12697 do *Lactobacillus rhamnosus*, (1), 7,5% da cepa CHCC12697 (2), e 15% da cepa CHCC12697 do *Lactobacillus rhamnosus*, (3). Os valores do desvio padrão foram calculados a partir de três replicações.

A Figura 2 ilustra a evolução do pH em iogurte durante 42 dias. Foram feitos iogurtes com uma cultura de bactérias do acido láctico que continha múltiplas cepas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* que continham 0% de cepa CHCC12697 do *Lactobacillus rhamnosus*, (1), 7,5% da cepa CHCC12697 (2), e 15% da cepa CHCC12697 do *Lactobacillus rhamnosus*, (3). Os valores do desvio padrão foram calculados a partir de três replicações.

A Figura 3 mostra as medições reológicas com relação a iogurtes. Os iogurtes foram feitos a partir de uma cultura de bactérias do acido láctico que continha múltiplas cepas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* que continham 0% de cepa CHCC12697 do *Lactobacillus rhamnosus*, (1), 7,5% da cepa CHCC12697 (2), e 15% da cepa CHCC12697 do *Lactobacillus rhamnosus*, (3). Os valores do desvio padrão foram calculados a partir de três replicações.

A Figura 4 mostra o diacetil em iogurtes. Os iogurtes foram feitos a partir de uma cultura de bactérias do acido láctico que continha múltiplas cepas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* que continham 0% de cepa CHCC12697 do *Lactobacillus rhamnosus*, (1), 7,5% da cepa CHCC12697 (2), e 15% da cepa CHCC12697 do *Lactobacillus rham-*

*nosus*, (3). Os valores do desvio padrão foram calculados a partir de duas replicações.

A Figura 5 mostra as concentrações de compostos voláteis (VOC) no leite fermentado depois da fermentação com uma única cepa CHCC12697 do *Lactobacillus rhamnosus*, (inoculada á 0,003 g/l) ou de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (inoculada á 0,003 g/l) em base de iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*) (inoculados em um total de 0,007 g/l) a 43°C em leite.

A Figura 6 mostra as concentrações de compostos voláteis (VOC) no leite fermentado depois da fermentação com uma única cepa CHCC12697 do *Lactobacillus rhamnosus*, (inoculada á 0,003 g/l) ou de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (inoculada á 0,003 g/l) em base de iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*) (inoculados em um total de 0,007 g/l) a 43°C em leite.

A Figura 7 mostra avaliação sensorial do sabor de diacetil em queijo Gouda 40+ com (LBArh I2697) ou sem (nenhum adjunto) a adição do *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (inoculado a 0.02 % (p/p)) depois de 7 semanas de amadurecimento. Os resultados foram apresentados como o valor sensorial médio com 95,0 por cento de intervalos de Distante Menos Significativos.

A Figura 8 mostra avaliação sensorial do odor de diacetil em queijo Gouda 40+ com (LBArh I2697) ou sem (nenhum adjunto) a adição do *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (inoculado a 0.02 % (p/p)) depois de 7 semanas de amadurecimento. Os resultados foram apresentados como o valor sensorial médio com 95,0 por cento de intervalos de Distante Menos Significativos.

A Figura 9 mostra a quantidade de diacetil detectada no queijo Gouda 40+ com (LBArh I2697) ou sem (nenhum adjunto) a adição do *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 (inoculado a 0.02 % (p/p)) depois de 7 e 19 semanas de amadurecimento, respectivamente. Os resultados foram apresentados como o valor médio de diacetil (proporção Sinal/ Ruído) com intervalos de desvio padrão.

## DESCRÍÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

### Definições

Na forma usada aqui, neste pedido de patente, a expressão "bactérias do ácido lático" indica uma bactéria gram-positiva, micro aerófila ou anaeróbica, que fermenta açúcares com a produção de ácidos incluindo o ácido lático como o ácido predominantemente produzido, ácido acético e ácido propiônico. As bactérias do ácido lático mais úteis industrialmente são encontradas dentro da ordem dos ""Lactobacillales" que inclui Lactococcus spp., Streptococcus spp., Lactobacillus spp., Leuconostoc spp., Pseudoleuconostoc spp., Pediococcus spp., Brevibacterium spp., Enterococcus spp. e Propionibacterium spp. Além dessas, bactérias do ácido lático que pertencem ao grupo das bactérias estritamente anaeróbicas, isto é as Bifidobacterium spp., são geralmente incluídas no grupo das bactérias do ácido lático. Essas bactérias são usadas frequentemente como culturas de alimentos de forma isolada ou em combinação com outras bactérias do ácido lático.

As bactérias do ácido lático, incluindo as bactérias das espécies Lactobacillus spp. e Streptococcus thermophilus, são normalmente fornecidas para a indústria de laticínios tanto como culturas congeladas ou secadas por congelamento para a preparação de iniciadores em volume ou como as chamadas culturas "Direct Vat Set" (DVS), por certo para a inoculação dentro de um recipiente de fermentação ou cuba para a produção de produtos de laticínio, tais como um produto de leite fermentado ou queijo. Essas culturas de bactérias do ácido lático são em geral referidas como "culturas de partida" ou "iniciadoras".

\*O termo "mesófilo" aqui, neste pedido de patente, se refere a micro-organismos que prosperam melhor em temperatura moderada (15°C – 40°C). As bactérias mesófilas úteis mais usados na indústria incluem as Lactococcus spp. e Leuconostoc spp. A expressão "fermentação mesófila" aqui, neste pedido de patente, se refere a uma fermentação em uma temperatura entre cerca de 12°C e cerca de 35°C. A expressão "p roduto de laticínio mesófilo" se refere a produtos de laticínio preparados através de fermentação mesófila de uma cultura de partida mesófila e inclui tais produtos de laticínio

como o soro de leite coalhado, leite fermentado, leite cultivado, "esmetana", creme fermentado e queijo fresco tal como o queijo "quark", "tvarog" e creme.

O termo "termófilo" aqui, neste pedido de patente, se refere a micro-organismos que prosperam melhor em temperaturas acima de 43°C. As 5 bactérias termófilas úteis mais usados na indústria incluem as *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp. A expressão "fermentação termófila" aqui, neste pedido de patente, se refere a uma fermentação em uma temperatura acima de cerca de 35°C. A expressão "produto de laticínio termófilo" se refere a produtos de laticínio preparados através de fermentação mesófila de uma cultura 10 de partida mesófila e inclui tais produtos de laticínio como o iogurte.

O termo "leite" é para ser entendido como a secreção látea obtida através da ordenha de qualquer mamífero, tal como vacas, ovelhas, cabras, búfalos e camelos. Em uma modalidade de preferência, o leite é o leite 15 de vaca. O termo leite também inclui soluções de proteína/ gorduras feitas a partir de materiais vegetais, como por exemplo, o leite de soja.

A expressão "substrato de leite" pode ser qualquer material de leite em bruto ou processado que possa ser submetido à fermentação de acordo com o método da invenção. Dessa forma, os substratos de leite úteis incluem, porém não estão limitados a, soluções/ suspensões de qualquer 20 leite ou de produtos do tipo de leite que compreendam proteína, tal como o leite total ou leite de baixo teor de gordura, leite desnatado, soro de leite coalhado, leite em pó reconstituído, leite condensado, leite em pó, soro de leite, permeado de soro de leite, lactose, líquido mãe a partir da cristalização da lactose, concentrado de proteína do soro do leite, ou creme. Obviamente, o 25 substrato de leite pode ser originado a partir de qualquer mamífero, por exemplo, sendo substancialmente leite de mamífero substancialmente puro, ou leite em pó reconstituído.

Antes da fermentação, o substrato de leite pode ser homogeneizado e pasteurizado de acordo com os métodos conhecidos na técnica.

30 "Homogeneização", na forma usada aqui, neste pedido de patente, significa uma misturação intensa pra ser obtida uma suspensão ou emulsão solúvel. De homogeneização for realizada antes da fermentação, ela pode

ser executada de tal forma a romper a gordura do leite em pedaços menores de forma que ela já não se separe do leite. Isso pode ser conseguido através de forçar o leite em pressão elevada através de pequenos orifícios.

"Pasteurização" na forma usada aqui, neste pedido de patente. 5 significa o tratamento do substrato de leite para a redução ou a eliminação da presença de organismos vivos, tais como os micro-organismos. De preferência, a pasteurização é conseguida através da manutenção de uma temperatura especificada durante um período de tempo especificado. A temperatura especificada é usualmente conseguida através de aquecimento. A temperatura e a duração podem ser selecionadas com a finalidade de matar ou inativar determinadas bactérias, tais como as bactérias prejudiciais. Uma 10 etapa de resfriamento rápido pode se seguir.

"Fermentação" nos métodos da presente invenção significa a conversão de carboidratos em álcoois ou ácidos através da ação de um micro-organismo. De preferência, a fermentação no método da invenção compreende a conversão de lactose em ácido lático. 15

Os processos de fermentação a serem usados na produção de produtos de laticínios são bem conhecidos e a pessoa versada na técnica irá saber como selecionar condições de processo adequadas, tais como temperatura, oxigênio, quantidade e características do(s) micro-organismo(s) e tempo do processo. Obviamente, as condições de fermentação são selecionadas de tal forma a sustentar a realização da presente invenção, isto é, obter um produto de laticínio em forma sólida (tal como um queijo) ou líquida (tal como um produto de leite fermentado). 20

25 No presente contexto, a expressão "estresse de cisalhamento" determina a viscosidade. A viscosidade (unidade é Pa s) é definida como o Estresse de cisalhamento (Pa)/ Taxa de cisalhamento (1/s).

O valor da taxa de cisalhamento é informada como um padrão aqui, neste pedido de patente, em uma taxa de cisalhamento = 300. Experimentos sensoriais mostraram (dados não mostrados) que a melhor correlação entre as medições reológicas e a viscosidade sensória/ espessura na boca é encontrada quando é usada a medição de viscosidade em uma taxa 30

de cisalhamento de 300 1/s.

No presente contexto, o termo "mutante" deve ser entendido como uma cepa derivada a partir de uma cepa da invenção por meio de, por exemplo, engenharia genética, radiação, luz UV e/ou tratamento químico 5 e/ou métodos que induzem mudanças no genoma. É de preferência que o mutante seja um mutante de funcionalidade equivalente, como por exemplo, um mutante que tenha substancialmente as mesmas propriedades ou propriedades melhoradas (como por exemplo, com relação à produção de diacetil, viscosidade, dureza de gel, revestimento da boca, sabor, pós acidificação, velocidade de acidificação, e/ou robustez ao fago) como a cepa de origem. Tal mutante é uma parte da presente invenção. Especialmente, o termo "mutante" se refere a uma cepa obtida através de submeter uma cepa da invenção a qualquer tratamento de metagênese usado de forma convencional incluindo o tratamento com um mutágeno químico, tal como o sulfonato 10 de etano metano (SEM) ou N-metil-nitro-N'-nitroguanidina (NTG), luz UV ou a um mutante de ocorrência espontânea. Um mutante pode ter sido submetido a vários tratamentos de metagênese (um único tratamento deve ser entendido como contendo uma tampa de metagênese seguido por uma etapa de triagem/ seleção, porém é presentemente de preferência que não mais do 15 que 20, ou não mais do que 10, ou não mais do que 5 tratamentos (ou etapas de triagem/ seleção) sejam executados. Em um mutante presentemente de preferência, menos do que 5%, ou menos do que 1% ou mesmo menos do que 0,1% dos nucleotídeos no genoma da bactéria tenham sido deslocados com outro nucleotídeo, ou cancelado, quando comparado com a cepa 20 de origem.

O uso dos termos "um/ uma", e "um/ uma", e "o/a" e referências similares no contexto da descrição da invenção (especialmente no contexto das reivindicações que se seguem) são para serem considerados como cobrindo ambos o singular e o plural) a não ser que indicado de outra forma 30 aqui, neste pedido de patente, ou claramente contradito através do contexto. Os termos "compreendendo", "tendo", "incluindo" e "contendo" são para serem considerados como de final aberto (isto é, significando "incluindo, porém

não limitado a") a não ser que notado de outra forma. A recitação das faixas de valores aqui, neste pedido de patente são meramente destinadas a servir como um método de taquigrafia de se referindo individualmente a cada valor separado de caia dentro da faixa, a não ser que indicado de outra forma a-  
 5 qui, neste pedido de patente, e cada valor separado é incorporado dentro da especificação como ele fosse recitado individualmente aqui, neste pedido de patente. Todos os métodos descritos aqui, neste pedido de patente podem ser executados em qualquer ordem adequada a não ser que indicado de outra forma aqui neste pedido de patente ou contradito de outra forma cla-  
 10 ramente pelo contexto. O uso de qualquer e de todos os exemplos, ou de linguagem de exemplo (como por exemplo, "tal como") provido aqui, neste pedido de patente é destinado meramente a iluminar melhor a invenção e não representa uma limitação sobre o âmbito da invenção a não ser que reivindicado de outra forma. Nenhuma linguagem na especificação deve ser  
 15 considerada como indicando qualquer elemento não reivindicado como es-  
 sencial com relação a pratica da invenção.

#### Implementação e aspectos da invenção

Os inventores da presente invenção descobriram de forma surpreendente que através da inoculação e da fermentação de um substrato de leite com uma cepa do *Lactobacillus rhamnosus* em adição a uma cultura de partida é possível conferir sobre o produto de laticínio resultante um sabor cremoso agradável sem afetar de forma negativa a textura do produto de laticínio, o tempo de fermentação e de pos acidificação.  
 20

O sabor cremoso melhorado foi detectado em produtos de laticí-  
 25 nio preparados tanto através de processos de fermentação mesófila (26°C e 30°C) como termófila (43°C) na presença de um *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 que foi depositada com a German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) sob o número de acesso DSM24616.

Pela expressão "sabor cremoso melhorado" é entendido que o  
 30 conteúdo de diacetil e/ou de acetoína no produto é aumentado e/ou que o sabor cremoso do produto como determinado por um painel sensório é mel-  
 horado quando comparado a um produto que não compreenda uma cepa de

*Lactobacillus rhamnosus* de acordo com a presente invenção.

Sem querer estar ligado à teoria, é cogitado que o sabor cremoso melhorado conferido ao produto de laticínio através da cepa do *Lactobacillus rhamnosus* de acordo com a presente invenção é devido à produção aumentada de diacetil e/ou de acetoína pela cepa de *Lactobacillus rhamnosus*.

O produto de laticínio em uma modalidade de preferência é um produto de leite fermentado ou um queijo com um teor baixo ou sem nenhum gordura que não tem essencialmente um sabor cremoso quando uma cepa de *Lactobacillus rhamnosus* de acordo com a presente invenção não tenha sido usada na fermentação ou não tenha sido usada na fermentação.

A cepa de *Lactobacillus rhamnosus* como descrita aqui, neste pedido de patente é útil em uma composição para a preparação de um produto de laticínio que compreenda pelo menos uma cultura de partida e cepa de *Lactobacillus rhamnosus*.

\*Tipicamente essa composição compreende a bactéria em uma forma concentrada incluindo concentrados congelados, secados ou secados por congelamento tendo tipicamente uma concentração de células viáveis que esteja na faixa de  $10^4$  até  $10^{12}$  cfu (unidades de formação de colônia) por grama da composição incluindo pelo menos  $10^4$  cfu por grama da composição, tal como pelo menos  $10^5$  cfu/g, como, por exemplo, pelo menos  $10^6$  cfu/g, tal como pelo menos  $10^7$  cfu/g, como, por exemplo, pelo menos  $10^8$  cfu/g, tal como pelo menos  $10^9$  cfu/g, como, por exemplo, pelo menos  $10^{10}$  cfu/g, tal como pelo menos  $10^{11}$  cfu/g. Dessa forma, a composição antimicrobiana da invenção está de preferência presente em uma forma congelada, secada ou secada por congelamento, como por exemplo, uma cultura Direct Vat Set (DVS).

No entanto, na forma usada aqui, neste pedido de patente a composição antimicrobiana também pode ser um líquido que seja obtido depois da suspensão dos concentrados de células congelados, secados ou secados por congelamento em um meio líquido tal como a água ou um tampão de PBS. Quando a composição antimicrobiana da invenção for uma suspensão, a concentração de células viáveis fica na faixa de  $10^4$  até  $10^{12}$  cfu (unidades de formação de colônia) por ml da composição incluindo

pelo menos  $10^4$  cfu por ml da composição, tal como pelo menos  $10^5$  cfu/ ml, como, por exemplo, pelo menos  $10^6$  cfu/ ml, tal como pelo menos  $10^7$  cfu/ ml, como, por exemplo, pelo menos  $10^8$  cfu/ ml, tal como pelo menos  $10^9$  cfu/ml, como, por exemplo, pelo menos  $10^{10}$  cfu/ ml, tal como pelo me-  
5 nos  $10^{11}$  cfu/ml.

A composição pode alem disso, conter como outros componen-  
tes crioprotetores e/ou aditivos convencionas incluindo nutrientes tais como  
os extratos de levedura, açúcares e vitaminas, como, por exemplo, as vita-  
minas A, C, D, K ou as vitaminas da família das vitaminas B. os crioproteto-  
res adequados que podem ser adicionados às composições da invenção são  
componentes que melhoram a tolerância ao frio dos micro-organismos, tais  
como o manitol, sorbitol, tripolifosfato de sódio, xilitol, glicerol, rafinose, mal-  
todextrina, eritritol, treotol, trehalose, glicose e frutose. Outros aditivos à  
composição podem incluir, como por exemplo, carboidratos, aromas, mine-  
10 rais, enzimas (como por exemplo, coalho, lactase e/ou fosfolipase).  
15

Como é normal em processos de fermentação de bactérias do  
ácido lático a aplicação de uma cultura mista como uma cultura de partida, a  
composição irá em determinadas modalidades compreender uma multiplici-  
dade de cepas tanto que pertençam à mesma espécie ou que pertençam a  
20 espécies diferentes. Um exemplo típico de uma tal composição útil de bacté-  
rias de ácido lático é uma cultura de partida que seja uma mistura de uma  
cepa de *Lactobacillus bulgaricus* e uma cepa de *Streptococcus thermophilus*.

Em uma modalidade de preferência da presente invenção a cul-  
tura de partida é uma cultura de partida termófila e a composição é adequa-  
25 da para a fermentação termófila.

Em outra modalidade de preferência a cultura de partida é sele-  
cionada a partir do grupo que consiste dos gêneros *Streptococcus* e *Lacto-  
bacillus*. A cultura de partida em uma modalidade de preferência compreen-  
de pelo menos uma cepa de *Lactobacillus lactis*. A cultura de partida pode  
30 compreender qualquer cepa de *Lactobacillus lactis* conhecida na técnica, tal  
como cepas a partir da subs. *cremoris* do *Lactobacillus lactis*, *Lactococcus*  
*lactis* subsp. *hordniae* ou *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Em ainda outra

modalidade de preferência, a cultura de partida compreende uma cepa de subs. *cremoris* do *Lactobacillus lactis*, e uma cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

A composição pode ser usada para a preparação de um produto  
5 de laticínio com um sabor cremoso melhorado.

Em uma modalidade de preferência, o produto de laticínio é um produto de leite fermentado, tal como um iogurte. Em outra modalidade de preferência o produto de laticínio é um queijo.

Em uma modalidade de preferência, o produto de laticínio con-  
10 tém, de preferência pelo menos 0,75 ppm de diacetil, tal como pelo menos 1,0 ppm de diacetil, tal como, pelo menos 1,5 ppm de diacetil. O produto de laticínio mesófilo pode conter entre cerca de 0,75 ppm e 3,00 ppm de diace-  
til, de mais preferência entre cerca de 1,0 e 2,50 ppm de diacetil e de maior preferência entre cerca de 1,5 ppm e 2 ppm de diacetil. Em uma modalidade  
15 de preferência o produto de laticínio mesófilo contém mais do que 1,5 ppm de diacetil. A pessoa versada na técnica estará ciente dos numerosos méto-  
dos para a determinação do conteúdo de diacetil no produto de laticínio da invenção, por exemplo, o conteúdo pode ser determinado através de méto-  
dos cromatográficos adequados tal como cromatografia de gás de espaço de  
20 cabeçote estático (HSGC).

Como dito acima, um aspecto da invenção se relaciona a um método para a fabricação de um produto de laticínio com um sabor cremoso, que compreende:

(a) inoculando um substrato de leite com a composição de acor-  
25 do com o primeiro aspecto da invenção;  
(b) fermentando o substrato de leite;  
(c) adicionando opcionalmente micro-organismos e/ou aditivos ao substrato de leite;  
(d) opcionalmente pós tratando o substrato de leite; e  
30 (e) opcionalmente embalando o produto de laticínio.

Como descrito acima, o substrato de leite a ser usado na etapa  
(a) pode ser qualquer material de leite em bruto ou processado que possa

ser submetido à fermentação de acordo com o método da invenção.

O substrato de leite pode ser inoculado com a composição acima através de qualquer método adequado. Por exemplo, o substrato de leite pode ser inoculado através de inoculação direta dentro de um recipiente de

5 fermentação.

Em uma modalidade de preferência a etapa (b)m compreende a fermentação do substrato de leite em uma temperatura acima de cerca de 37°C. A fermentação será realizada de preferência e m uma temperatura de entre cerca de 38°C e cerca de 45°C, de mais prefer ência entre cerca de

10 39°C até cerca de 42°C. Em outra modalidade de pref erência, o substrato de leite será fermentado a cerca de 40°C. Os processos de fermentação a serem usados para a produção dos produtos de laticínio são bem conhecidos e a pessoa versada na técnica irá saber como selecionar condições de processo adequadas, tais como temperatura, oxigênio, quantidade e caracterís-  
15 ticas do(s) micro-organismo(s) e tempo de processo. Obviamente, as condi-ções de fermentação são selecionadas de forma a ser obtido um produto de leite fermentado adequado para a produção de um produto de laticínio com um sabor melhorado e uma textura elevada.

Outros micro-organismos ou aditivos podem ser adicionados ao substrato de leite antes, durante e depois da fermentação do substrato de leite na etapa (b). Is micro-organismos que podem ser adicionados ao subs-  
20 trato de leite irão contribuir de uma maneira vantajosa com relação às pro-  
priedades do produto de laticínio. Por exemplo, os micro-organismos podem

melhorar ou sustentar a produção de diacetil, a viscosidade, a rigidez do gel,  
25 o aroma, a pós-acidificaçãoe/ou a velocidade de acidificação mo produto de laticínio. Opcionalmente, outros ingredientes podem ser adicionados ao

substrato de leite, tais como cores, estabilizadores, como, por exemplo, pec-  
tina, amido, amido modificado, CMC, etc.; ou ácidos graxos poli não satura-  
dos, como, por exemplo, ácidos graxos omega-3. Esses ingredientes podem  
30 ser adicionados em qualquer ponto durante o processo de produção, como por exemplo, antes ou depois da fermentação.

O substrato de leite pode ainda ser pós-tratadoatravés de qual-

quer dispositivo necessário para a criação do produto de laticínio desejado. Por exemplo, outros componentes, tais como crioprotetores e/ou aditivos convencionais incluindo nutrientes tais como extratos de levedura, açúcares e vitaminas, podem ser adicionados ao substrato de leite. Além disso, o substrato de leite pode, por exemplo, ser homogeneizado ou tratado com calor, isto é pasteurizado.

O produto de laticínio pode ser embalado de qualquer maneira adequada conhecida na técnica. Por exemplo, o produto de laticínio pode ser embalado em um recipiente vedado tendo um volume na faixa de, por exemplo, 25 até 1500 ml. O produto pode ser embalado em qualquer ponto durante o processo de produção, como por exemplo, embalado próximo à etapa de inoculação em seguida fermentado na embalagem.

Os produtos de laticínio, que são obtidos através do método, incluem como exemplos típicos de produtos tais como iogurte, creme de leite, queijo e soro de leite coalhado.

Um produto de laticínio que pode ser obtido através do método acima também faz parte da presente invenção.

Em uma modalidade de preferência o produto de laticínio é um produto de leite fermentado. De preferência, o produto de leite fermentado é um iogurte.

Em ainda outra modalidade de preferência, o produto de laticínio é um queijo.

Em uma modalidade de preferência o produto de laticínio contém pelo menos 0,75 ppm de diacetil, tal como pelo menos 1,0 ppm de diacetil, tal como pelo menos 1,5 ppm de diacetil.

\*Parei aqui conferir para cimaO quinto aspecto da invenção de refere ao *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 que foi depositada com a German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) sob o número de acesso DSM24616. Além dessa cepa, a invenção diz respeito a mutantes que possam ser derivados a partir da mesma, isto é, que eles possam ser obtidos através da utilização da cepa CHCC12697 que foi depositada, como um material de partida. A cepa mutante pode ser derivada a partir

da cepa CHCC12697 por meio de engenharia genética, radiação, luz UV e/ou tratamento químico e/ou métodos que induzam mudanças no genoma. Um mutante de acordo com a invenção terá essencialmente as mesmas características como a cepa de origem em termos de níveis de produção de 5 acetato, acetaldeído, diacetil e/ou acetoína. É de preferência que o mutante produza essencialmente pelo menos 80% ou mais, pelo menos 90% ou mais, pelo menos 95% ou mais, ou ainda até 100% ou mais de acetato, acetaldeído, diacetil e/ou acetoína quando comparado com a cepa de origem do mesmo.

10 Fica claro para a pessoa versada na técnica que através da utilização da cepa depositada como o material de partida, o leitor versado na técnica pode através de técnicas de mutagênese convencional ou de re-isolamento de rotina obter outros mutantes ou derivados dos mesmos que retenham as características relevantes e as vantagens descritas aqui, neste 15 pedido de patente. Por consequência, a expressão "mutante da mesma" do primeiro aspecto se refere a cepas mutantes obtidas através da utilização da cepa depositada como o material de partida.

Modalidades da presente invenção estão descritas abaixo, a título de exemplos não limitativos.

## 20 EXEMPLOS

Exemplo 1: Triagem com relação ao *Lactobacillus* ssp. termófilos , com altos níveis de acetoína em leite fervido acidificado.

Uma seleção de 175 de cepas da *Lactobacillus* ssp. foi examinada com relação à capacidade de acidificar leite fervido a 30°C, 37°C, 40°C 25 e 433°C durante aproximadamente 24 horas. O leite fervido acidificado a partir de incubações a 37°C foi examinado diretamente depois da fermentação com relação a compostos voláteis (VOC) por meio de cromatografia de gás de espaço de topo, como descrito no Exemplo 5. Uma cepa, denominada CHCC12697, foi considerada como produzindo níveis elevados de acetoína (135 ppm) e também níveis bastante elevados de acetaldeído (8 ppm) (dados não mostrados). A cepa foi observada no leite fervido acidificado tanto em temperaturas mesófilas (30 – 37°C) bem como em temperaturas ter-

mófilas (40 – 43°C). A cepa também foi observada como se desenvolvendo em um OD elevado em caldo de cultura MRS suplementado com 2% de glicose ou 2% de lactose ou 2% de frutose ou 2% de galactose a 40 e 43°C. A cepa não foi resistente a antibióticos. O sequenciamento parcial do rRNA gene 16S mostrou que a cepa era o *Lactobacillus rhamnosus*.

Exemplo 2: Método para a fabricação de iogurte.

Leite desnatado ((DanMaelk, Aria) foi fortificado com leite desnatado em pó (Ária) e tratado com calor durante 20 minutos a 90°C. Essa solução foi inoculada com uma cultura de partida de fundo e com ou sem a cepa CHCC12697 do *Lactobacillus rhamnosus*.

A cultura de partida de fundo usada para fazer o iogurte foi composta de múltiplas cepas do *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* em forma de Direct Vat Set (F-DVS) congelada inoculada em uma taxa de 0,02%. a cepa do *Lactobacillus rhamnosus*, na forma de F-DVS foi adicionada à cultura de partida de fundo na quantidade descrita na seção de resultados. Na inoculação, a contagem de células foram acima de  $1 \times 10^{10}$  cfu/g com relação às cepas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus* e acima de  $1 \times 10^8$  cfu/g para as cepas do *Lactobacillus rhamnosus*.

A solução inoculada foi aquecida para 43°C e fermentada até o pH 4,55. O tempo para alcançar o pH 4,55 é o tempo de fermentação que é mostrado na fig. 1, Quando o pH de 4,55 foi alcançado, o iogurte foi bombeado através de uma unidade de pós tratamento a 225°C e em uma pressão de 2 bar e enchido dentro de copos plásticos que foram em seguida colocados em armazenagem fria. As medições reológicas foram feitas depois de um dia de armazenagem fria. A evolução do pH no iogurte foi medida depois de 1, 14, 28 e 42 dias de armazenagem fria. As medições do diacetil foram feitas depois de 7 dias de armazenagem fria.

Exemplo 3: Método para a medição da evolução do pH.

No dia d análise (depois de 1, 14, 28 e 42 dias de armazenagem fria) um copo de plástico que continha o iogurte foi retirado da armazenagem fria e o pH foi medido com a utilização de um medidor de pH (pHM240, Me-

terLab). Antes das medições, o medidor de pH foi calibrado (calibração de 2 pontos com 7,00 e 4,01 de tampões). Como as amostras, os tampões usados para a calibração foram armazenados em frio. A Figura 2 mostra a evolução do pH.

5           **Exemplo 4:** Método para a medição da firmeza e da viscosidade.

A firmeza do gel foi medida através do uso de um reômetro Anton Paar com um trocador de amostra automático (Physica DSR Rheometer + ASC). O pendulo de medição foi colocado no copo de medição que continha 20 ml de amostra de iogurte que tinha sido agitada de forma manual e aquecida para 13°C. Depois de que o pendulo tinha sido colocado na amostra de iogurte um tempo de espera foi aplicado. Por ter um tempo de espera, a maioria da estrutura que tinha sido quebrada pela colocação do pendulo no copo só reconstruída. Em seguida a firmeza do gel foi medida através de oscilação. Nesse contexto o esforço foi mantido constante a 0,3% e a frequência foi aumentada a partir de 0,06 Hz para 30 Hz. A partir dessas medições, o modulo elástico ( $G'$ ) e o modulo viscoso ( $G''$ ) puderam ser calculados, e a partir desses o modulo complexo ( $G^*$ ) foi obtido:

$$G^* = \sqrt{G'^2 + G''^2}$$

G\* a 1 HZ foi em seguida correlacionado à firmeza do gel e usado para a comparação das diferentes amostras (Figura 3).

20           Com a utilização do mesmo equipamento (reômetro Anton Paar) a viscosidade foi medida através do aumento da taxa de cisalhamento a partir de 0,2707 1/s até 300 1/s com pontos de medição (esforço de cisalhamento) a cada 10 segundos. A taxa de cisalhamento foi em seguida diminuída a partir de 275 1/s para 0,2707 1/s com pontos de medição a cada 10 segundos. A viscosidade do produto foi relacionada ao esforço de cisalhamento a 300 e/s em uma medição da curva de fluxo e mostrada na Figura 3.

**Exemplo 5:** Método para a medição dos compostos voláteis (VOC).

As amostras de iogurte foram analisadas através de cromatografia de gás estática de espaço de topo (HSGC), que é uma técnica poderosa para a análise de voláteis em matrizes complexas. A configuração consistiu

de um amostrador de Static Head Space conectado ao cromatógrafo de gás com um detector de ionização e chama (FID). Abaixo está uma relação da aparelhagem (incluindo a coluna) e do software usado:

- HS-auto amostrador: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.
- 5 HS-software: HSControl v.2.00, Perkin Elmer.
- GC: Autosystem XL, Perkin Elmer.
- GC-software: Turbochrom navigator, Perkin Elmer.
- Coluna: HP-FFAP 25 m x 0.20 mm x 0.33 µm, Agilent Technologies.

10 Foram usados padrões de concentração conhecidos para a determinação dos fatores de resposta (calibração), foram usados controles para controlar que os fatores de resposta usados eram estáveis dentro de uma serie analítica bem como das series intermediarias e ao longo do tempo (meses). A concentração de voláteis (ppm) nas amostras e nos controles foi  
15 determinada com a utilização dos fatores de resposta que vieram a partir dos padrões.

As amostras foram preparadas através da adição de 200 µl de um 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para uma amostra de iogurte de 1 grama.

20 O teor de diacetil é mostrado na Figura 4.  
Os gráficos da Fig. 4 resumem os resultados obtidos no iogurte feito com culturas de bactérias do ácido láctico com e sem a cepa CHC 12687 do *Lactobacillus rhamnosus*.

25 A presença da cepa CHCC12687 do *Lactobacillus rhamnosus* na cultura de bactérias do ácido láctico usada para a fabricação do iogurte não influenciou o tempo de fermentação (Figura 1), pós-acidificação(Figura 2) ou as características reológicas do iogurte (Figura 3).

30 Quando a cepa CHCC12687 do *Lactobacillus rhamnosus* está presente na cultura de bactérias do ácido láctico usadas para a fabricação do iogurte, quantidades significativamente mais elevadas de diacetil podem ser medidas no iogurte (Figura 4).

#### Exemplo 6: Análise sensorial do iogurte.

Com a finalidade de documentar o efeito da presença do *Lacto-*

*bacillus rhamnosus* cepa CHCC12687 em uma cultura de iogurte, uma avaliação sensória do sabor cremoso foi realizada com a utilização de um painel treinado. O teste foi executado como um teste de comparação pareada 2-APC (APC = escolha alternativa forçada). Este teste é apropriado quando

5 duas amostras devem ser avaliadas com focalização em um atributo – neste caso o sabor cremoso. Este teste deve ser considerado como de um só lado na medida em que a finalidade foi a de confirmar que a presença do *Lactobacillus rhamnosus* cepa CHCC12687 resultou em um sabor cremoso aumentado.

10 A partir de um total de 20 porções, foi pedido aos assessores que apontassem a amostra a partir de duas) que tivesse a maior intensidade do sabor cremoso. O iogurte que continha a cepa CHCC12687 do *Lactobacillus rhamnosus* foi apontado entre de 15 a 20 porções como tendo a intensidade mais alta do sabor cremoso. Este número constitui uma diferença

15 significativa ( $\alpha = 0.05$ ).

Referências para o teste pareado de comparação 2-AFC (AFC = escolha alternativa forçada):

Meilgaard M.C., Civille, G.V. & Carr, B.T. (2007). Sensory Evaluation Techniques, 4th Ed . Chapter 7 : Attribute Difference Tests: How does attribute X Differ Between Samples? pp. 105-128. CRC Press

Exemplo 7: Triagem de VOC relevantes para o gosto do iogurte produzido por duas cepas de *Lactobacillus rhamnosus*.

Para a determinação do efeito em termos de VOC relevantes com relação ao gosto do iogurte pelo uso de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12534, respectivamente em produtos de leite fermentado foram realizados testes com relação às condições de fermentação de iogurte (43°C) em leite (0,1 % de gordura, 3,7% de proteína e 4,8% de lactose) nos quais as cepas foram testadas de forma isolada ou com (30% do inoculum) de cultura de iogurtes (*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) como plano de fundo. Os níveis de acetoina, acetaldeído, etanol e diacetil foram determinados depois de 16 horas de fermentação como descrito no Exemplo 5.

Os testes foram realizados em pratos de micro titulação com a utilização de leite (0,1% de gordura, 3,7% de proteína e 4,8% de lactose) e culturas de um dia para o outro de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 e *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12534 (10 g/l). A manipulação do líquido foi feita por robô Multiprobe II Plus (Perkin Elmer).

*Resultados:*

Tabela 1:

Níveis de VOC em leite fermentado com CHCC12534 e CHCC12697 ou uma cultura de iogurte (de fundo).

		<u>Acetaldeído</u>	<u>Etanol</u>	<u>Diacetil</u>	<u>Acetoína</u>
10	CHCC12534 (0,003 g/l)	2,8	2,4	2,7	60,5
	CHCC12697 (0,003 g/l)	3,7	1,9	2,8	67,4
	Fundo (0,007 g/l)	5,8	1,8	1,8	36,5
	Leite	0,1	0,3	0,0	0,0

15 Ambos a CHCC12534 e a CHCC12697 produzem níveis significativamente mais altos de diacetil e acetoína do que a cultura de iogurte usada como pano de fundo mesmo em menos do que metade da proporção de inoculação. A cultura de iogurte produz níveis de acetaldeído significativamente mais altos (taxa de inoculação muito alta). Os perfis de CHCC12534  
20 e de CHCC12697 não são significativamente diferentes um do outro em um único nível de cepa (Tabela 1 e Figura 5).

Tabela 2:

Níveis de VOC em leite fermentado com CHCC12534 e uma cultura de iogurte (CHCC12534 e fundo), CHCC12697 e uma cultura de iogurte (CHCC12697 e fundo), ou uma cultura de iogurte (fundo).

		<u>Acetaldeído</u>	<u>Etanol</u>	<u>Diacetil</u>	<u>Acetoína</u>
25	CHCC12534 (0,003 g/l) e fundo 90,007 g/l	3,7	2,4	5,0	61,8
	CHCC12697 (0,003 g/l) e fundo 90,007 g/l	12,7	4,2	5,2	127,9
30	Fundo (0,007 g/l)	5,8	1,8	1,8	36,5
	Leite	0,1	0,3	0,0	0,0

A cepa CHCC12697 (30% de inoculum) com um fundo de cultura de iogurte produz níveis significativamente mais altos de acetoína, acetaldeído e etanol quando comparada com a CHCC12534 (30% de inoculum) com um fundo de iogurte e comparada á culturas de fundo isoladas.

5 As CHCC12534 e CHCC12697 (ambas com 30 % de inoculum) com uma cultura de fundo de iogurte não produz níveis significativamente diferentes de diacetil (Tabela 2 e Figura 6).

A adição de 30% de CHCC12697 em uma cultura de iogurte resultou em um aumento de VOC de acordo com a Tabela 2.

10 Tabela 3:

Aumento de VOC em uma cultura de iogurte com a adição de 30% de CHCC12697 ou 30% de CHCC12534.

	Acetaldeído	119%	-38%
	Etanol	133%	33%
15	Diacetil	189%	178%
	Acetoína	246%	68%

Exemplo 8: Propriedades sensoriais de iogurte com *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697.

Para analisar a firmeza, espessura na boca e o sabor cremoso do iogurte com o *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697, foi feito o iogurte em recipientes de escala de 3 litros a partir de leite desnatado homogeneizado com 2% de leite desnatado em pó adicionado. A base foi pasteurizada a 92°C durante 20 minutos e resfriada para 43°C par a a inoculação. Uma cultura de partida de base (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*) foi inoculada a 0,02%. O *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697, foi adicionado como uma cultura de um dia para o outro (1,5 g por lote).

O iogurte foi fermentado até p pH 4,55, resfriado e embalado em recipientes de 200 ml. A avaliação sensorial da amostra foi feita 7 dias depois por um painel sensório de 5 membros. O painel usou amostra de referência (sem a adição de cultura de sabor) para a criação de pontos fixos (valor 0) para uma ordem de classificação das amostras. A amostra foi em seguida avaliada sendo comparada à amostra de referencia (-2 até 5) para ca-

da descritor e valores médios para todos os juizes foram usados para a geração de classificação de valores médios para cada um dos descritores. (Tabela 4).

Tabela 4:

- 5 Avaliação sensorial da amostra de iogurte com o *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 adicionado.

	<u>Firmeza</u> <u>do gel</u>	<u>Espessura</u> <u>na boca</u>	<u>Sabor</u> <u>cremoso</u>	<u>Acetaldeído</u>	<u>Diacetil</u>
CHCC12697	2	1,8	1,5	0,8	1,8
10 (Lb. <i>rhamnosus</i> )	Base/Sem sabor	0,1	0,5	1	0,1
					0,25

A adição da CHCC12697 ao iogurte resultou em uma elevada firmeza do gel, boa espessura na boca e um sabor cremoso mais acentuado.

Exemplo 9: Método para a fabricação de queijo Gouda 40+.

- 15 O queijo Gouda 40+ foi feito a partir de 150 litros de leite total pasteurizado (72°C durante 20 segundos). O leite foi resfriado para 5°C e ele foi padronizado de acordo com o nível de proteína (3,4 até 3,7%) com 38% de creme antes de ser usado (proporção de gordura para proteína). A padronização é calculada com base no conteúdo de proteína do leite e objetivando um queijo Gouda com 40% de gordura em matéria seca.

Depois da padronização o leite é pré-aquecido em um trocador de calor para a temperatura de pré-amadurecimento de 32°C e bombeado para dentro de cubas de queijo. Uma agitação lenta (235 rpm) foi continuada até que o coalho fosse disperso no leite.

- 25 O queijo Gouda 40+ foi feito com a utilização dos parâmetros da Tabela 5.

- Alem da adição de 0,01% (p/p) da cultura de acidificação (CHN-19, Chr. Hansen A/S), 0,02% (p/p) de coalho (Chy-Max Plus, Chr.Hansen A/S), 0,01% (p/p) CaCl<sub>2</sub> (solução a 34%) e 0,01% (p/p) de ácido nítrico foram adicionados a cada cuba de queijo. Uma cultura adjunta de 0,02% (p/p) de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 foi adicionada em uma cuba com a finalidade de testar o efeito da cepa sobre o odor e sabor do diacetil depois

de 7 semanas de amadurecimento.

Os queijos foram salgados durante 20 horas em uma salmoura a 22% a 10°C. Os queijos foram revestidos e embalados à vácuo em bolsas de plástico e armazenados a 0°C durante uma semana seguida por 3 semanas a 13°C e 2 semanas a 9°C. A seguir o Gouda 40+ foi armazenado a 5°C.

Tabela 5:

Parâmetro para a fabricação de queijo para o Gouda 40+

Etapa	Duração	Valor
Pré-fermentação	35 min	32°C
Tempo de coalho	35 min	
Pré-agitação	20 min	
Soro de leite fora	5 min	52,5 kg
Meia agitação	10 min	
Tempo de escaldação	15 min	38°C/45 kg de água a 51°C
Agitação final	40 min	
Coalhada para o fundo da cuba	5 min	
Pré-prensagem	25 min	1 bar/10 min – 2 bar/15 min
Prensagem 1	15 min	2 bar/15 min
Prensagem 2	15 min	3,5 bar/15 min
Prensagem 3	90 min	5 bar/90 min

Exemplo 10: Análise química do queijo.

10 Com a finalidade de documentar o efeito da presença do *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 em um queijo Gouda 40+, uma avaliação sensorial do odor e do sabor de diacetil, respectivamente, foi realizada com a utilização de um painel treinado.

15 A avaliação sensorial foi realizada com a utilização de um teste de classificação. As amostras foram mantidas a 13°C antes da avaliação sensorial. As amostras foram servidas de forma aleatória em caixas de plástico com uma tampa e etiquetadas com um número aleatório de três algarismos. As amostras de queijo foram classificadas em uma escala que ia a partir de 1 até 8, um sendo o odor ou sabor de baixa intensidade e sendo o

odor ou sabor de alta intensidade. Uma análise de variação foi executada para cada um dos descritores sensoriais. Os resultados da ANOVA foram explicadas por meio de um gráfico mostrando o valor médio do descritor sensório como avaliado por 12 assessores. Os gráficos também mostraram 5 um intervalo em torno de cada media. os intervalos exibidos coram baseados na diferença menos significativa no procedimento de Fisher (LSD). Elas foram consideradas de tal forma que se duas medias fossem a mesma, os intervalos das mesmas iriam se sobrepor em 95,0% do tempo. Qualquer par de intervalos que não se sobrepuxessem verticalmente indica um par de 10 medias com diferença estatisticamente significativa.

A adição do *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 ao queijo Gouda 40+ aumentou de forma significativa a percepção sensória do odor e do sabor do diacetil (Figs. 7 e 8).

Exemplo 11: Análise química do queijo.

15 Com a finalidade de documentar o efeito da presença do *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 em um queijo Gouda 40+, foi realizada uma análise química do conteúdo de diacetil com a utilização de cromatografia de gás côo descrito no Exemplo 5, exceto com relação a preparação da amostra do queijo. Plugues de queijo foram amostrados com a utilização de uma 20 seringa de 3 ml descartável. O fundo foi removido com uma faca, e a seringa foi empurrada para dentro do queijo, cortando dessa forma um plugue. O plugue foi transferido para um frasco com um espaço de topo de 20 ml. Para a análise dos compostos sensíveis ao oxigênio, o frasco foi esguichado com nitrogênio antes do fechamento do mesmo com uma tampa. Não foi adicionado nenhum ácido às amostras de queijo.

A adição do *Lactobacillus rhamnosus* CHCC12697 ao queijo Gouda 40+ aumentou de forma significativa o nível de diacetil no queijo (Fig. 9).

DEPOSITOS E SOLUÇÃO DE ESPECIALISTA

30 O requerente requer que uma amostra dos micro-organismos depositados declarados abaixo só possa ser tornada disponível para um especialista, até a data na qual a patente for concedida.

O *Lactobacillus rhamnosus* cepa CHCC12697 foi depositado em 01-03- 2011 na German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig e foi dado o número de acesso No.: 5 DSM 24616.

O deposito foi feito de acordo com o tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional de deposito de micro-organismos para as finalidades de procedimentos de patente.

#### REFERÊNCIAS

- 10 Jyoti, B.D., Suresh, A.K., and Venkatesh, K.V. (2003): Diacetyl production and growth of *Lactobacillus rhamnosus* on multiple substrates. World Journal of Microbiology & Biotechnology 19 : 509-514.  
US 4.678.673 (Marshall et al.)  
US 4.867.992 (Boniello et al.)
- 15 US 5.236.833 (Duboff et al.)

**TRATADO DE BUDAPESTE  
SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MICRO-  
ORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSAMENTO DE MATÉRIA DE PATENTES**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Chr. Hansen A/S  
Boege Allé 10-12  
2970 Hoersholm  
Denmark

**RECIBO NO CASO DE DEPÓSITO ORIGINAL**  
emitido por força da regra 7.1 pela  
**AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO**  
identificada abaixo

<b>I. IDENTIFICAÇÃO DO MICRO-ORGANISMO</b>		
Referência de identificação fornecida pelo depositante	Número de acesso fornecido pela AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO	
<b>CHCC12697</b>	<b>DSM 24616</b>	
<b>II. DESCRIÇÃO CIENTÍFICA E/OU DESIGNAÇÃO TAXONÔMICA PROPOSTA</b>		
O micro-organismo identificado acima (I) foi acompanhado por:  <input checked="" type="checkbox"/> descrição científica <input type="checkbox"/> designação taxonômica proposta  (Marcar com um X quando aplicável).		
<b>III. RECIBO E ACEITAÇÃO</b>		
A presente Autoridade Internacional de Depósito aceita o micro-organismo identificado acima (I), o qual foi recebido em 01-03-2011 (data do depósito original) <sup>1</sup> .		
<b>IV. RECIBO DE REQUERIMENTO PARA CONVERSÃO</b>		
O micro-organismo identificado acima (I) foi recebido pela presente Autoridade Internacional de Depósito em (data do depósito original) e o requerimento para a conversão do depósito original em um depósito conforme tratado de Budapeste foi recebido em (data do recibo do requerimento para conversão).		
<b>V. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>		
Nome:  Endereço:	DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Inhoffenstr. 7 B D-38124 Braunschweig	Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de representação da Autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)
		Data: 07-03-2011

<sup>1</sup> Quando aplicável a Regra 6.4 (d), a referida data é a data a qual o status na Autoridade Internacional de depósito foi obtido.

**TRATADO DE BUDAPESTE  
SOBRE O RECONHECIMENTO INTERNACIONAL DO DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS PARA FINS DE PROCESSAMENTO DE MATÉRIA DE PATENTES**

**FORMATO INTERNACIONAL**

Chr. Hansen A/S  
Boege Allé 10-12  
2970 Hoersholm  
Denmark

**DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE**  
Emitido por força da regra 10.2 pela  
**AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO**  
identificada abaixo

<b>1. DEPOSITANTE</b>		<b>2. IDENTIFICAÇÃO DO MICROORGANISMO</b>
Nome: Chr. Hansen A/S Boege Allé 10-12 Endereço: 2970 Hoersholm Denmark		Número de acesso fornecido pela <b>AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>  <b>DSM 24616</b>  Data do depósito ou da transferência <sup>1</sup> :  01-03-2011
<b>3. DECLARAÇÃO DE VIABILIDADE</b>		
A viabilidade do micro-organismo identificado na coluna 2 acima foi testada em 01-03-2011 <sup>3</sup> . Nesta data, o referido micro-organismo estava		
<input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viável <input type="checkbox"/> <sup>3</sup> não mais viável		
<b>4. CONDIÇÕES SOB AS QUAIS O TESTE DE VIABILIDADE FOI CONDUZIDO<sup>4</sup></b>		
<b>5. AUTORIDADE INTERNACIONAL DE DEPÓSITO</b>		
Nome: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Endereço: Inhoffenstr. 7 B D-38124 Braunschweig		Assinatura(s) da(s) pessoa(s) tendo o poder de representação da Autoridade Internacional de Depósito ou de oficial(is) responsável(is)  Data: 07-03-2011

<sup>1</sup> Indica a data do depósito original ou, onde um novo depósito ou uma transferência foi feita, a data relevante mais recente (data do novo depósito ou data de transferência).

<sup>2</sup> Nos casos que fazem referência à Regra 10.2 (a) (ii) e (iii), considerar o teste de viabilidade mais recente.

<sup>3</sup> Marcar com um x a opção aplicável.

<sup>4</sup> Preencher se as informações foram requeridas e se os resultados do teste foram negativos.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição adequada para a preparação de um produto de laticínio, caracterizada pelo fato de que compreende uma cultura de partida e uma cepa do *Lactobacillus rhamnosus*, em que a cepa do *Lactobacillus rhamnosus* é a *Lactobacillus rhamnosus* CHCC 12697 que foi depositada com a German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ) sob o número de acesso DSM24616.
- 5 2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a cultura de partida é uma cultura de partida termófila.
- 10 3. Composição, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a cultura de partida é selecionada a partir do grupo que consiste do gênero *Lactococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus*.
- 15 4. Uso de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de um produto de laticínio.
- 5 5. Uso, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o produto de laticínio é um produto de leite fermentado.
6. Uso, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o produto de leite fermentado é um iogurte.
- 20 7. Uso, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o produto de laticínio é um queijo.
8. Uso, de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 7, caracterizado pelo fato de que o produto de laticínio compreende 0,75 ppm de diacetil ou mais.
- 25 9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o produto de laticínio compreende 1,5 ppm de diacetil ou mais.
10. Método para a produção de um produto de laticínio, caracterizado pelo fato de que compreende:
  - (a) inocular um substrato de leite com a composição de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção; e
  - 30 (b) fermentar o substrato de leite.
11. Método de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo

fato de que compreende

- (c) adicionar outros micro-organismos e/ou aditivos ao substrato de leite;
- (d) pós tratar o substrato de leite; e
- 5 (e) embalar o produto de laticínio.

12. Método, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de que a etapa (b) compreende fermentar o substrato de leite em uma temperatura acima de 35°C.

1/5

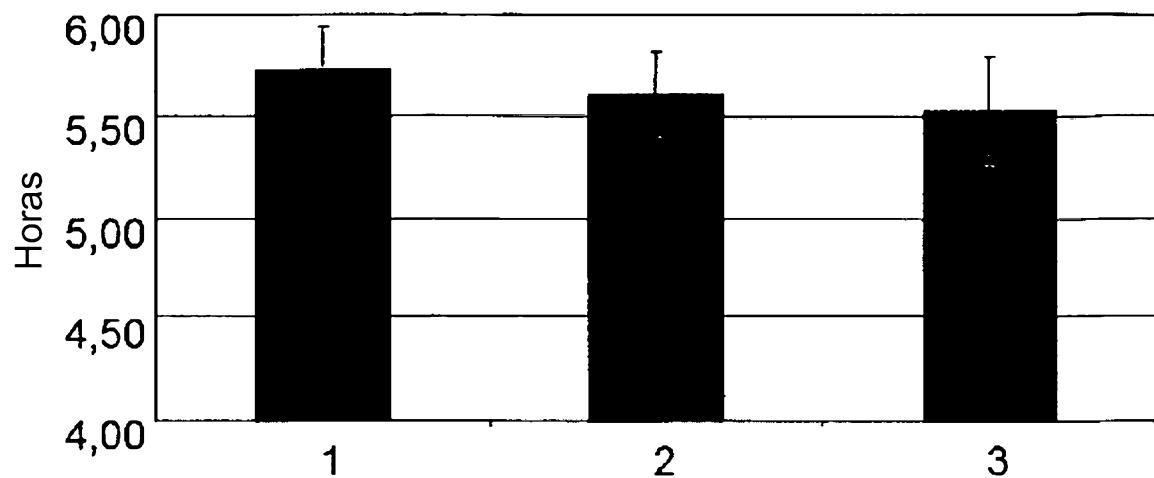


FIG. 1

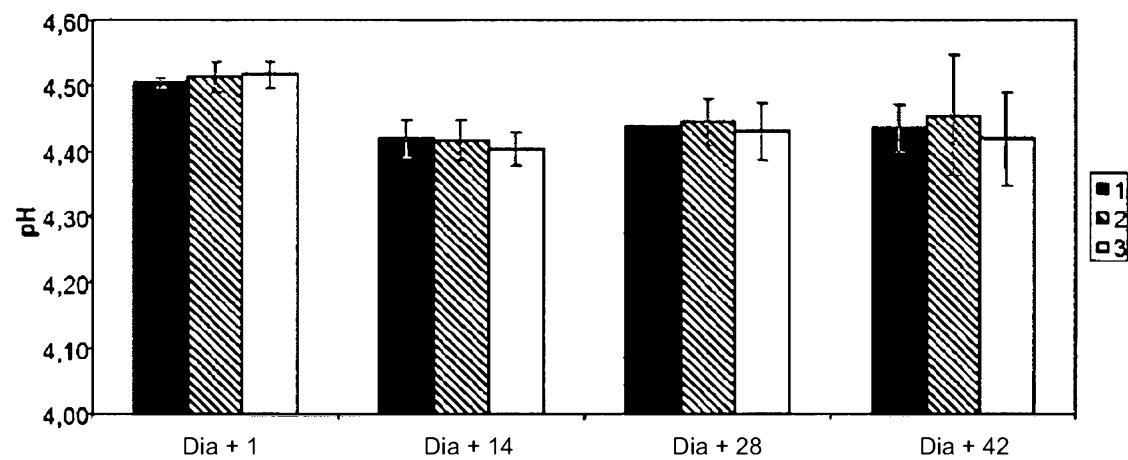


FIG. 2

2/5

Estresse de cisalhamento  
a 300 1;s )os)

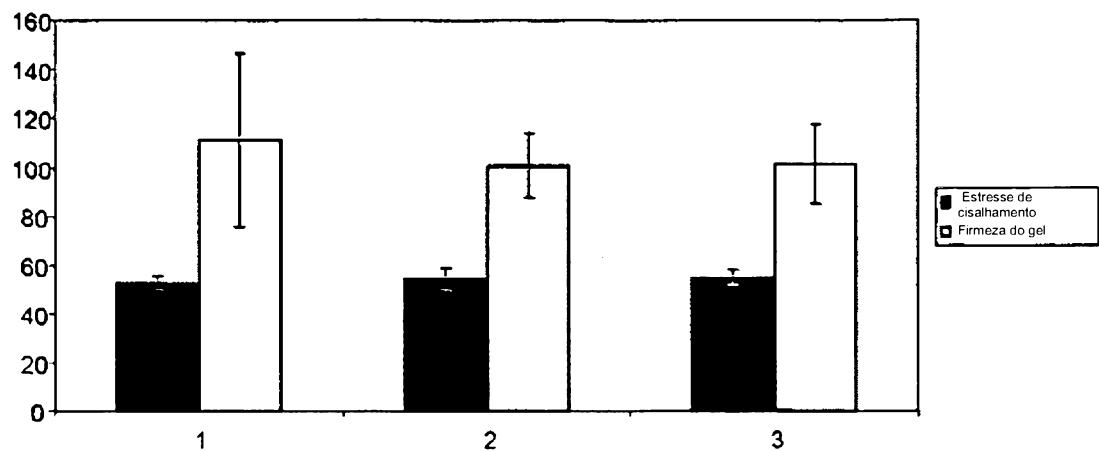


FIG. 3

Diacetil (ppm)

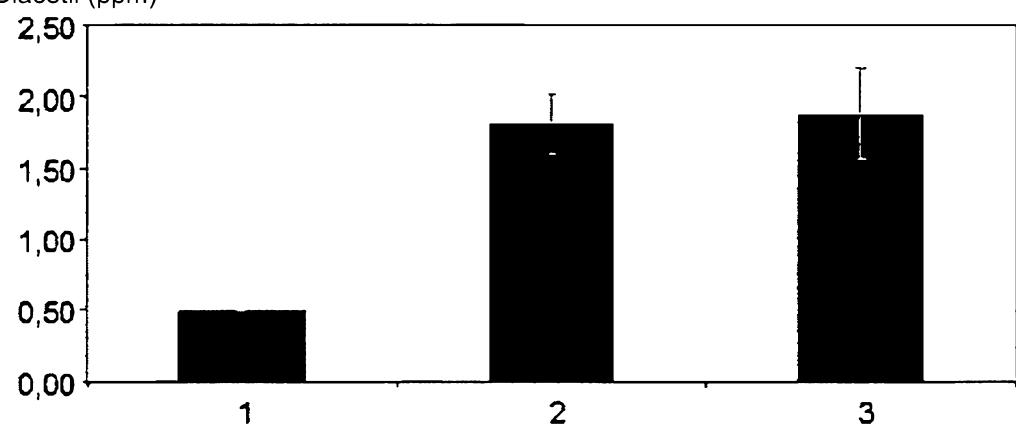


FIG. 4

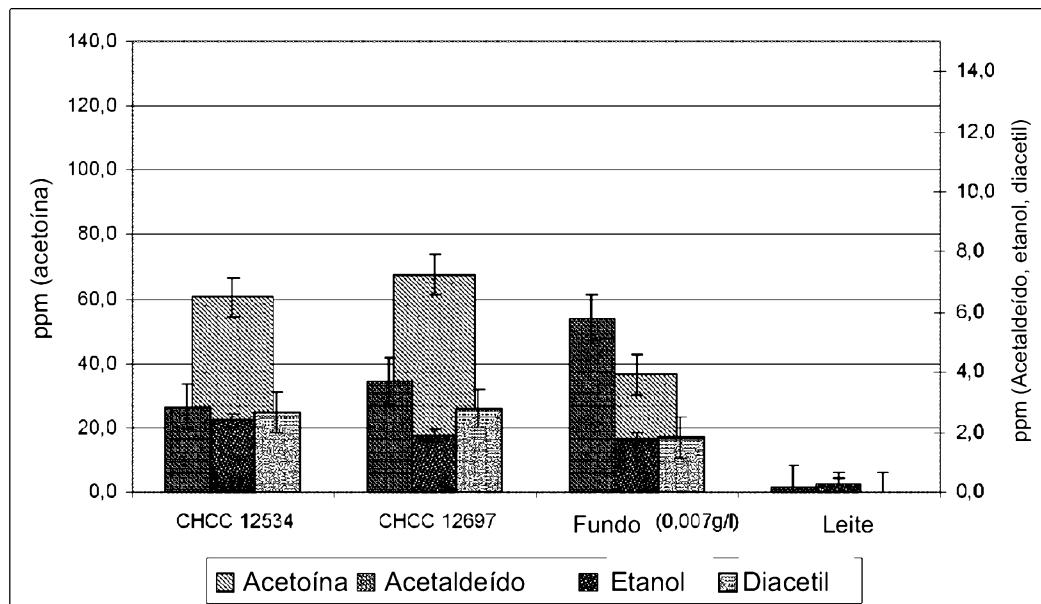


FIG. 5

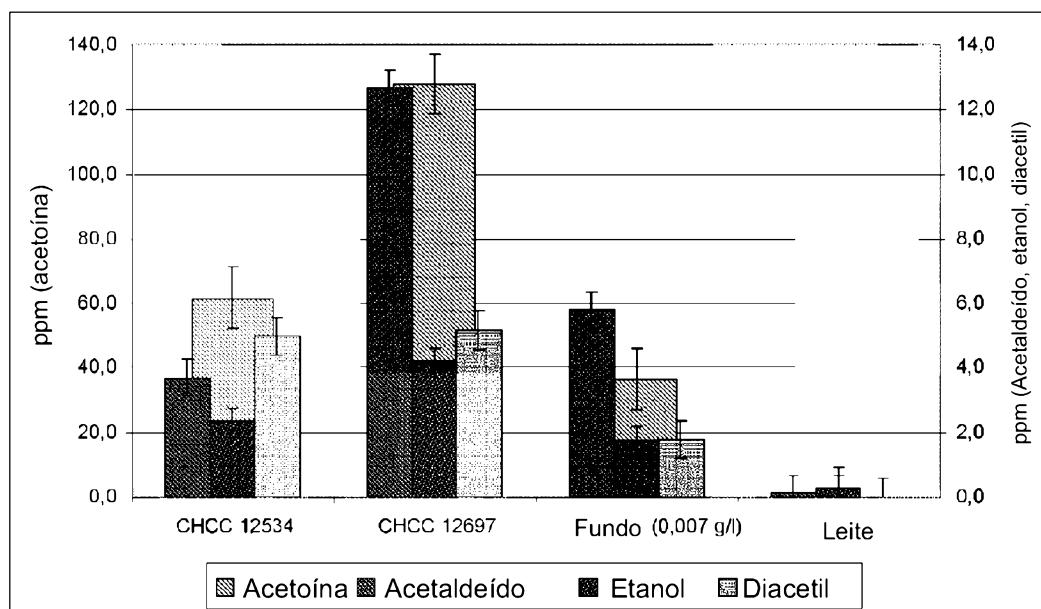


FIG. 6

4/5

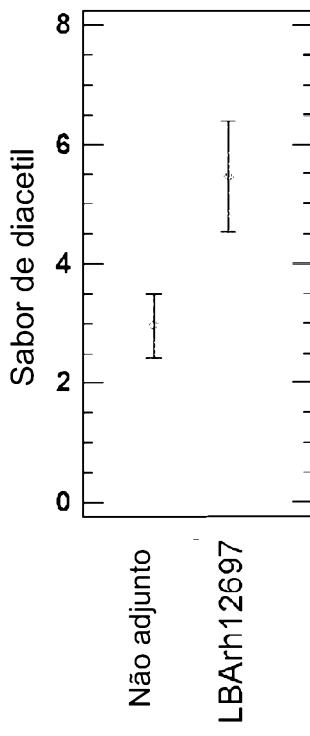


FIG. 7

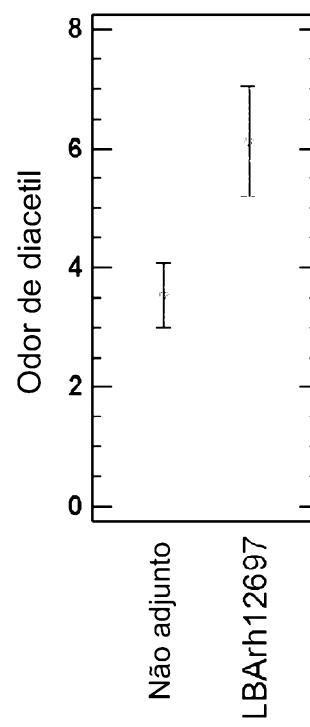


FIG. 8

FIG. 9

