

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0714162-9 A2**

(22) Data de Depósito: 01/06/2007
(43) Data da Publicação: 26/12/2012
(RPI 2190)



(51) *Int.Cl.:*
A23C 9/13
A23C 9/123

(54) Título: INÓCULO QUE É ESPECIALMENTE ADAPTADA À SEMEADURA DIRETA DE PELO MENOS UMA CEPAS DE BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SSP. LACTIS EM UM SUBSTRATIVO LÁCTEO, GRÂNULO CONGELADO, LIOFILIZADO, E, PROCESSO DE ESTIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO E/OU DO METABOLISMO DE B. ANIMALIS LACTIS SOBRE SUBSTRATO LÁCTEO.

(30) Prioridade Unionista: 13/07/2006 FR 0606421

(73) Titular(es): Compagnie Danone

(72) Inventor(es): Laurent Marchal, Xavier Dhoosche

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT FR2007000916 de 01/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/006949de 17/01/2008

(57) Resumo: INÓCULO QUE É ESPECIALMENTE ADAPTADO À SEMEADURA DIRETA DE PELO MENOS UMA CEPAS DE BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SSP. LACTIS EM UM SUBSTRATO LÁCTEO, GRÂNULO CONGELADO, LIOFILIZADO, E, PROCESSO DE ESTIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO E/OU DO METABOLISMO DE B. ANIMALIS LACTIS SOBRE SUBSTRATO LÁCTEO. O presente pedido se refere a um inóculo que é especialmente adaptado à semeadura direta de pelo menos uma cepa de Bifidobacterium animalis ssp. lactis em um substrato lácteo, para a transformação deste substrato lácteo em produto lácteo fermentado. Este inóculo compreende, em mistura ou sob a forma de coleção, L-cisteína base, e pelo menos uma cepa de B. animalis lactis. A referida cisteína e a referida, pelo menos uma, cepa de B. animalis lactis estão, cada uma, contida em, ou sob a forma de grânulo(s) em congelado(s) e/ou de liofilizado(s). Vantajosamente, a referida cisteína é integrada nos mesmos grânulos ou no mesmo liofilizado que as células de B. animalis lactis.

“INÓCULO QUE É ESPECIALMENTE ADAPTADO À SEMEADURA DIRETA DE PELO MENOS UMA CEPA DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SSP. *LACTIS* EM UM SUBSTRATO LÁCTEO, GRÂNULO CONGELADO, LIOFILIZADO, E, PROCESSO DE ESTIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO E/OU DO METABOLISMO DE *B. ANIMALIS LACTIS* SOBRE SUBSTRATO LÁCTEO”

DOMÍNIO TÉCNICO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere aos grânulos de cisteína, e suas utilizações a título de ativadores de crescimento de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

No domínio dos produtos lácteos, o mercado de probióticos está em constante crescimento.

A fim de propor produtos que contenham níveis elevados de cepas probióticas que trazem, ao mesmo tempo, qualidades organolépticas interessantes, as indústrias lácteas são confrontadas com problemas de fermentações mistas que empregam ao mesmo tempo fermentos ditos técnicos ou tecnológicos, e fermentos probióticos.

Com efeito, as cepas ditas probióticas são representadas por espécies com crescimentos lentos sobre substrato lácteo (tempo de geração de 1 h a 2 h para *Bifidobacterium*), enquanto que os fermentos tecnológicos provêm de fermentos iogurte com crescimento muito rápido (tempo de geração de 15 min a 30 min para *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*).

É difícil de encontrar a boa relação entre o crescimento de fermentos tecnológicos e probióticos, e a maior parte das indústrias favorece o aspecto organoléptico em relação à quantidade de probiótico: As populações de probiótico geralmente observadas situam-se entre 10^6 a 10^7 ufc/g de produto fermentado.

Atualmente, a maior parte dos estudos de saúde sobre estes

probióticos é realizada por produtos que contêm no mínimo 10^8 ufc/g de cepas probióticas.

5 A pesquisa de um composto ativador de crescimento de um probiótico é baseada no conhecimento aprofundado da cepa no nível destas necessidades nutritivas e na capacidade do substrato lácteo preenchê-las.

Por outro lado, é necessário verificar que estes compostos não exerçam efeito negativo, nem estimulem o crescimento das cepas ditas técnicas, sejam elas de qualidade alimentar, e que não degradem a organoleptia do produto.

10 Além disso, as quantidades de compostos ativadores que se deve empregar para ter uma estimulação e que preenchem as restrições acima são geralmente muito baixas em proporção em relação aos substratos lácteos.

Estas doses (geralmente inferiores a 100mg/l) e os desvios aceitos não são compatíveis com os sistemas de medidas e de incorporações utilizados para realizar os substratos lácteos, o emprego industrial destas substâncias se torna então problemático.

O problema é ainda mais delicado quando as cepas ditas técnicas empregadas devem funcionar no quadro de uma simbiose de várias cepas de bactérias lácticas, como é o caso dos leites fermentados que empregam uma fermentação simbiótica *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, além da fermentação láctica efetuada pelos probióticos.

Diferentes testes foram conduzidos na técnica anterior a fim de determinar condições que permitam favorecer o crescimento do probióticos. A maior parte destes ensaios, no entanto foi efetuada sobre culturas puras de bactérias probióticas, sem levar em conta a presença eventual e atividade de outras cepas lácticas durante a fabricação do produto em meio industrial.

25 Uma solução é descrita no pedido de patente francês FR 05 07529 depositado em 15 de Julho de 2005 em nome de Compagnie Gervais Danone: ela propõe utilizar um ácido aminado sulfurado a título de ativador

de bifidobactérias.

O presente pedido propõe um aperfeiçoamento que é adaptado especialmente às cepas de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*. O presente pedido propõe assim um inóculo que não apresenta os inconvenientes da técnica anterior, e que resolve o problema da ativação e/ou estimulação simples, segura e eficaz de *B. animalis lactis* durante a produção em meio industrial de um produto lácteo fermentado com valor probiótico que é destinado para o consumo humano, e mais particularmente um produto lácteo fermentado que, além da fermentação operada pelo probiótico *B. animalis lactis*, emprega a fermentação simbiótica *S. thermophilus* - *L. bulgaricus*.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere a um inóculo aperfeiçoado de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, às utilizações deste inóculo, e aos produtos lácteos fermentados obtidos através deste inóculo.

O inóculo da invenção é adaptado especialmente à semeadura direta de pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis* em um substrato lácteo, para a transformação deste substrato lácteo em produto lácteo fermentado adaptado para o consumo humano, e mais particularmente em produto lácteo fermentado com valor probiótico que contém pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis*.

O inóculo compreende, em mistura ou sob a forma de coleção, grânulos congelados e/ou um (uns) liofilizado(s), nos quais se encontram a L-cisteína particular, e pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis*.

Os inventores selecionaram uma forma particular de cisteína, a saber uma L-cisteína que está sob uma forma tal que os grânulos e/ou liofilizado(s) produzidos a partir desta cisteína tenham (uma vez descongelados e/ou ressolubilizado(s)) um pH que é pelo menos igual a 4. Um exemplo de uma L-Cisteína apropriada é a L-Cisteína comumente denominada cisteína base (cuja fórmula sob forma reduzida é

HSCH₂CH(NH₂)CO₂H).

Esta forma particular de cisteína é mais eficaz que as outras formas de cisteína habitualmente utilizadas (geralmente, da cisteína-HCl, sob forma de cloridrato monoidratado de cisteína).

5 Apesar da baixa solubilidade da L-cisteína particular selecionada pelos inventores, os inventores tiveram êxito ao produzir um inóculo sob forma de grânulos congelados e/ou de liofilizado(s), que combina ou integra células de *B. animalis lactis* e esta forma particular de L-cisteína, sem, no entanto, prejudicar o estado fisiológico e/ou o metabolismo de *B.*
10 *animalis lactis*.

Em uma versão dita «integrada» do inóculo de acordo com a invenção, pelo menos um grânulo ou liofilizado do inóculo contém ao mesmo tempo células de *B. animalis lactis* e esta forma particular de L-cisteína. Em uma versão dita «combinada» do inóculo de acordo com a invenção, uma
15 parte dos grânulos ou um liofilizado contém a L-cisteína particular de acordo com a invenção, e uma outra parte dos grânulos ou outro liofilizado contém as células de *B. animalis lactis*.

A presente invenção propõe conseqüentemente um inóculo de *B. animalis lactis* como ativador cisteína combinado ou integrado.

20 De maneira notável, o inóculo de acordo com a invenção permite obter uma população da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existirem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*), que não desce abaixo de $5 \cdot 10^7$ *ufc*, de preferência não abaixo de 10^8 *ufc*, por grama de produto fermentado, após pelo menos 20 dias, de preferência pelo menos 30 dias de conservação do produto fermentado a uma
25 temperatura compreendida entre 4 e 11°C (*cf.* Figuras 8 e 9).

O inóculo de acordo com a invenção é adaptado especialmente para a produção de leite fermentado com alto valor probiótico, na medida em que permite manter um teor muito forte de *B. animalis lactis* durante a

conservação do produto em meio refrigerado, e na medida em que o ativador L-Cisteína particular utilizado está presente em doses tais que nem sobre a simbiose *S. thermophilus* + *L. bulgaricus*, nem as qualidades organolépticas do leite fermentado, se encontram negativamente afetadas.

5 BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

No presente pedido de patente, faz-se referência às seguintes figuras:

Figura 1: esquema de princípio:

- 10 - a solução combinada, que propõe produzir grânulos de fermento(s) probiótico(s) e grânulos de cisteína, estes dois tipos de grânulos podendo ser em seguida misturados juntos, e
- a solução integrada, que propõe produzir grânulos que contêm ao mesmo tempo o(s) fermento(s) probiótico(s) e a cisteína.

15 Figura 2: esquema de princípio da produção de grânulos integrados (cisteína HCl + fermento(s) probiótico(s)): fermento *Bifidobacterium animalis lactis* cepa I-2494 ou cepa BB12®, formulado em grânulos integrados, contendo ao mesmo tempo o fermento probiótico e a cisteína, a cisteína sendo aqui a cisteína HCl.

20 Figura 3: evolução do pH ao longo do tempo para um mix lácteo inoculado com:

- grânulos de *Bifidobacterium animalis lactis* cepa I-2494 (curva de controle, situada abaixo), ou com
- grânulos integrados que contêm ao mesmo tempo *Bifidobacterium animalis lactis* cepa I-2494 e cisteína HCL (curva na parte superior),

25 ilustrando a degradação do estado fisiológico que sofre o probiótico *Bifidobacterium animalis lactis*, quando é formulado com a cisteína HCl no meio dos mesmos grânulos (formulação integrada com Cisteína HCl).

Figura 4: esquema de princípio da produção de grânulos integrados (cisteína base + fermento(s) probiótico(s)): fermento *Bifidobacterium animalis lactis* cepa I-2494 ou cepa BB12®, formulado em grânulos integrados, contendo ao mesmo tempo o fermento probiótico e a cisteína, a cisteína sendo aqui a cisteína base.

Figura 5: evolução do pH ao longo do tempo para um mix lácteo inoculado com:

- grânulos de *Bifidobacterium animalis lactis* cepa I-2494 (curva de controle, situada na parte superior), ou com

- grânulos integrados que contêm ao mesmo tempo *Bifidobacterium animalis lactis* cepa I-2494 e cisteína base (curva na parte inferior),

ilustrando o fato de que a seleção de cisteína base para a formulação de grânulos integrados (*Bifidobacterium animalis lactis* + cisteína) permite não deteriorar o estado fisiológico deste probiótico.

Figuras 6 a 9: comparação de mix lácteos,

- que são semeados no nível de 0,5 g/L pelos grânulos congelados de fermentos técnicos (mistura de grânulos de *S. thermophilus* I-1630, *L. bulgaricus* - I-1632 e *L. bulgaricus* I-1519), e grânulos congelados de fermento probiótico *Bifidobacterium animalis lactis* (cepa BB12®, ou cepa I-2494), e

- nos quais se traz a cisteína base sob forma de grânulos de cisteína distintos dos grânulos de fermento probiótico (solução combinada G4), ou sob forma integrada aos grânulos de fermento probiótico (solução integrada G4I), por comparação ao mix testemunha no qual a água é trazida no lugar da cisteína integrada;

Figuras 6 e 7: evolução do pH ao longo do tempo (em horas);

Figuras 8 e 9: evolução da biomassa (UFC/ml) ao longo do tempo (em dias) durante a conservação do produto lácteo fermentado a 10°C;

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

- mix lácteo BB12® T = mix lácteo semeado no nível de 0,5 g/L por uma mistura de grânulos de fermentos técnicos e de grânulos testemunha de fermento *Bifidobacterium* BB12® (grânulos contendo água ao invés de cisteína),

- mix lácteo BB12® G4 = mix lácteo semeado como o mix lácteo BB12® T, notadamente no nível de 0,5 g/L por uma mistura de grânulos de fermentos técnicos e de grânulos testemunha de fermento *Bifidobacterium* BB12®, mas no qual se acrescenta cisteína base sob forma de grânulos congelados distintos dos grânulos de probiótico, a fim de trazer uma concentração de 7,5 mg/l de cisteína no mix,

- mix lácteo BB12® G4I = mix lácteo semeado no nível de 0,5 g/L por uma mistura de grânulos de fermentos técnicos e grânulos integrados de fermento *Bifidobacterium* BB12®, estes grânulos integrados de probiótico contendo cisteína base, de modo a trazer 7,5 mg/l de cisteína base no mix;

Figuras 7 e 9: fermento probiótico *Bifidobacterium animalis lactis* I-2494

- mix lácteos 1-2494 T = mix lácteo semeado no nível de 0,5 g/L por uma mistura de grânulos de fermentos técnicos e de grânulos testemunha de fermento *Bifidobacterium* 1-2494 (grânulos contendo água ao invés de cisteína),

- mix lácteo 1-2494 G4 = mix lácteo semeado como o mix lácteo I-2494 T, a saber, até 0,5 g/L por uma mistura de grânulos de fermentos técnicos e de grânulos testemunha de fermento *Bifidobacterium* 1-2494, mas no qual se acrescenta a cisteína base sob forma de grânulos congelados distintos dos grânulos de probiótico, de modo a trazer uma concentração de 7,5 mg/l cisteína no mix,

- mix lácteo I-2494 G4I = mix lácteo semeado no nível de 0,5

g/L por uma mistura de grânulos de fermentos técnicos e grânulos integrados de fermento *Bifidobacterium* 1-2494, estes grânulos integrados de probiótico contendo a cisteína base, de modo a trazer 7,5 mg/l cisteína base no mix.

DESCRIÇÃO DETALHADA

5 Algumas definições:

No presente pedido, se dão a todos os termos o alcance e o significado que possuem geralmente no domínio da indústria de laticínios e/ou da indústria alimentar.

10 Assim, quando se faz referência a uma «fermentação láctica», trata-se de uma fermentação láctica acidificante, que se traduz em uma acidificação depois da produção de ácido láctico que pode se acompanhar de produção de outros ácidos, de dióxido de carbono, e de diversas substâncias tais como exopolissacarídeos (EPS) ou substâncias aromáticas, por exemplo diacetila e acetaldeído.

15 Do mesmo modo, entende-se por «fermento láctico», um micro-organismo ou uma cepa de micro-organismos vivo ou durável, que é capaz de efetuar tal fermentação láctica acidificante sobre um substrato lácteo.

20 Dá-se ao termo «leites fermentados» seu significado usual no domínio da indústria de laticínios, ou seja, produtos que são destinados ao consumo animal, e mais particularmente humano, e que são provenientes da fermentação láctica acidificante de um substrato lácteo. Estes produtos podem conter ingredientes secundários tais como frutas, vegetais, açúcares, aromas, etc.

25 A denominação de «leite fermentado» responde às normas oficiais estritas. Pode-se assim se reportar ao Codex Alimentarius (preparado pela Comissão do Codex Alimentarius sob a égide da FAO e do OMS, e publicado pela Divisão Informação da FAO, disponível em <http://codexalimentarius.net>; cf. mais particularmente, o volume 12 do Codex

Alimentarius «Normes Codes pour l  lait et les produits laitiers», e a norma «CODEX STAN A-11(a)-1975», cujo conteúdo é incorporado no presente pedido por referência).

5 Pode-se mais particularmente se reportar ao Decreto francês n 88-1203 de 30 de Dezembro de 1988 referente aos leites fermentados e ao iogurte ou coalhada, publicado no Jornal Oficial da République Française de 31 de Dezembro de 1988. O conteúdo deste Decreto é incorporado no presente pedido por referência.

10 O termo «leite fermentado» é assim reservado no presente pedido ao produto lácteo preparado com um substrato lácteo que sofreu um tratamento pelo menos equivalente   pasteuriza o, semeado com micro-organismos que pertencem à espécie ou às espécies características de cada produto. A coagula o dos «leites fermentados» não deve ser obtida por outros meios que não aqueles que resultem da atividade dos micro-organismos utilizados.

15 Um «leite fermentado» não sofreu nenhum tratamento que permite subtrair um elemento constitutivo do substrato lácteo empregado, e notadamente não sofreu um esgotamento do coágulo.

20 Um «leite fermentado» pode ser adicionado com um ou vários extratos de aromático, um ou vários aromas naturais, assim como, no limite de 30 a 100 em peso do produto acabado, de um ou vários a c ares e outros g neros alimentares que conferem um sabor específico, até de cereais.

 A incorpora o tanto de produtos de substitui o de materiais graxos e/ou prote nicos de origem não láctea é proibida.

25 A quantidade de ácido láctico livre contida em um leite fermentado não deve ser inferior a 0,6 grama a 100 gramas durante a venda ao consumidor, e o teor em matéria proteínica trazida na parte láctea não deve ser inferior àquela de um leite normal.

 O termo «substrato lácteo», no presente pedido, é entendido

como significando «leite» no sentido onde se entende a indústria de laticínios, ou seja, um substrato que contém essencialmente leite e/ou componentes do leite, e cuja composição é tal que a fermentação láctica deste substrato lácteo por cepas de bactéria(s) láctica(s), tal(is) como *S. thermophilus* e/ou *L. bulgaricus*, conduz a um produto que pode ser destinado a alimentação humana, e mais particularmente que responde a denominação de leite fermentado.

O termo «substrato lácteo» cobre assim o leite de origem animal sob todas suas formas e todas suas variantes de composições: leite desnatado ou não, leite concentrado ou não, leite ultrafiltrado ou não, leite fresco ou não, leite de pó ou não, leite reconstituído ou não, leite re combinado ou não, leite enriquecido em constituintes do leite ou não, leite adicionado ou não de agentes úteis à fabricação ou à qualidade do produto acabado, tais como agentes de sabor, aromas, açúcares, etc. Por exemplo, um substrato lácteo destinado à fabricação de leites fermentados, pode compreender leite desnatado, integral e pó de leite desnatado (cf. exemplo 1 abaixo).

O termo «substrato lácteo» não inclui, contudo, em seu alcance o significado de «meio de cultura». Com efeito, o termo «meio de cultura» visa um meio destinado a favorecer e/ou estimular o crescimento de bactérias lácticas, e por isso, produzir um inóculo de bactérias lácticas, enquanto que o termo «substrato lácteo» visa um meio que é destinado a sofrer uma transformação por fermentação, para produzir um alimento destinado a um consumo humano. Assim, numerosos compostos que podem ser acrescentados em um meio de cultura para estimular e/ou favorecer o crescimento de bactérias lácticas, não podem ser acrescentados em um substrato lácteo para a obtenção de um leite fermentado ou iogurte.

É notadamente o caso:

- de numerosos agentes tenso-ativos e/ou emulsificantes e/ou agentes solubilizantes e/ou detergentes, tais como o polioxietileno-sorbitano-

20-monooleato (também conhecido sob o nome de polisorbato 80, ou de Tween 80),

- de ácidos de tipo citrato, acetato,
- de extratos de carne,
- 5 - de peptonas vegetais,
- de glicerofosfato.

Os fermentos lácticos mais correntemente utilizados compreendem as bactérias lácticas seguintes:

10 - *Streptococcus thermophilus* (por exemplo, a cepa I-1630 disponível junto a CNCM), e

- *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, ou *Lactobacillus bulgaricus* (por exemplo, as cepas I-1519 e I-1362 disponíveis junto a CNCM), -

15 - *Pediococcus acidilacti*,
- *Leuconostoc*, tais como os:

- *Leuconostoc cremoris*,
- *Leuconostoc dextranicum*,
- *Leuconostoc lactis*,

20 - *Lactobacillus*, tais com os:

• *Lactobacillus acidophilus* (por exemplo, a cepa I-0967 disponível junto a CNCM),

• *Lactobacillus casei* (por exemplo, a cepa I-518 disponível junto a CNCM),

25 • *Lactobacillus helveticus*,

• *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* (por exemplo, a cepa I-2843 disponível junto no CNCM),

- *Lactococcus*, tais como:

- *Lactococcus cremoris*,
- *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* (por exemplo, a cepa I-1631

disponível junto a CNCM),

- *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* (por exemplo, a cepa I-2806 disponível junto a CNCM),

- *Bifidobacterium*, tais como os:

5 • *Bifidobacterium animalis lactis* (por exemplo, a cepa I -2494 disponível junto a CNCM, ou a cepa comercializada sob a referência BB12® por Chr. Hansen),

- *Bifidobacterium breve*,

- *Bifidobacterium bifidum*,

10 • *Bifidobacterium longum*,

- *Bifidobacterium infantis*.

As bactérias lácticas são definidas como sendo bactérias lácticas vivas que, quando são consumidas em quantidades suficientes, têm efeitos benéficos para a saúde, para além de seu valor nutritivo básico (definição oficial da Organização Mundial de Saúde).

15 As bactérias lácticas probióticas compreendem notadamente as bactérias lácticas seguintes:

- *Lactobacillus*, tais como os:

20 • *Lactobacillus acidophilus* (por exemplo, a cepa I-0967 disponível junto a CNCM),

- *Lactobacillus casei* (por exemplo, a cepa I-518 disponível junto a CNCM),

- *Lactobacillus helveticus*,

25 • *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *lactis* (por exemplo, a cepa I-2843 disponível junto a CNCM),

- *Bifidobacterium*, tais como as:

- *Bifidobacterium animalis lactis* (por exemplo, a cepa I-2494 disponível junto a CNCM, ou a cepa comercializada sob a referência BB12® por Chr. Hansen),

- *Bifidobacterium breve*,
- *Bifidobacterium bifidum*,
- *Bifidobacterium longum*,
- *Bifidobacterium infantis*.

5 As bactérias lácticas probióticas não são simples aditivos alimentares, que seriam suficientes acrescentar em massa ao produto lácteo. Tratam-se de bactérias vivas, que efetuam uma fermentação acidificante, e cujo metabolismo é afetado pelas condições sob as quais elas se encontram durante a fabricação do produto lácteo fermentado, e depois em seguida
10 durante a conservação do produto lácteo fermentado até o fim do prazo de validade (DLC).

Os prazos de validade dependem das durações legais de conservação fixadas pela legislação em vigor. Para os produtos lácteos fermentados frescos, tais como os leites fermentados, o DLC é geralmente de
15 30 dias a contar da data de fabricação.

Por fermento, bactéria ou cepa técnica entende-se aqui um fermento, bactéria ou cepa que participa na estrutura e/ou na textura do produto lácteo fermentado, em oposição ao fermento, bactéria ou cepa com função essencialmente probiótica.

20 Por exemplo, pode-se produzir um leite fermentado por fermentação simbiótica *L. bulgaricus* - *S. thermophilus*, empregando igualmente pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis* a título de cepa probiótica. Neste caso de figura, as cepas ditas técnicas são as cepas de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*.

25 Andamento e aspectos da invenção:

A invenção se refere a um inóculo que é especialmente adaptado para a sementeira direta de pelo menos uma cepa de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* em um substrato lácteo, para a transformação deste substrato lácteo em produto lácteo fermentado que é adaptado para o consumo

humano e que tem valor probiótico, assim como as utilizações deste inóculo no quadro da produção de tais produtos lácteos.

O inóculo de acordo com a invenção é mais particularmente adaptado à produção de produto lácteo fermentado, que é obtido por fermentação de um substrato lácteo probiótico pelo *B. animalis lactis*, e pela simbiose *S. thermophilus* - *L. bulgaricus*. Tal produto contém então pelo menos uma cepa de *S. thermophilus*, pelo menos uma cepa de *L. bulgaricus* e pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis* sob forma viva.

O inóculo de acordo com a invenção compreende pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis*.

O inóculo de acordo com a invenção compreende uma cisteína particular, notadamente a L-cisteína que está sob uma forma tal que os grânulos e/ou liofilizado(s) que são obtidos utilizando esta forma de L-cisteína são tais que o pH da solução obtida após:

- descongelamento do(s) referido(s) grânulo(s), e/ou
 - ressolubilização do(s) referido(s) liofilizado(s) em uma proporção que vai de 1 a 2 grama(s) de liofilizado(s) para 8 a 10 ml de H₂O, é pelo menos igual a 4.

De preferência, este pH não ultrapassa o pH de 8.

Para este efeito, escolher-se-á de preferência uma L-Cisteína sob uma forma tal que apresente um pH que está acima de 4 quando ela é colocada em solução. Por exemplo, uma solução contendo 1,25 gramas desta forma cisteína para 50 ml de H₂O apresenta um pH que vai de 4,5 a 5,5.

Um exemplo de tal forma de cisteína é a L-Cisteína geralmente denominada L-cisteína base (ou L-cisteína sob forma base). Sob forma reduzida, a L-Cisteína base tem por fórmula HSCH₂CH(NH₂)CO₂H.

A L-cisteína base não é a cisteína-HCl: ela não é conseqüentemente nem um cloridrato de cisteína, nem um cloridrato monoidratado de cisteína.

A escolha desta cisteína particular resulta de uma seleção feita entre as diferentes formas de cisteína disponíveis.

Esta cisteína particular é assimilável por *B. animalis lactis*, e é um ativador do crescimento de *B. animalis lactis* sobre substrato lácteo.

5 Esta cisteína particular é adaptada para o consumo humano. Ela está de acordo com as legislações relativas aos produtos lácteos fermentados destinados ao consumo humano.

Esta cisteína particular permite, além disso, estimular o crescimento, ou pelo menos o metabolismo de *B. animalis lactis*, sem perturbar o metabolismo das outras bactérias lácticas não probióticas, e notadamente sem perturbar a fermentação láctica simbiótica exercida por *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*.

Além de todas essas propriedades, esta cisteína particular permite produzir um inóculo dito integrado que compreende ao mesmo tempo a referida pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis* e cisteína em uma mesma unidade física, sem que o crescimento, ou pelo menos o metabolismo, desta cepa de *B. animalis lactis* seja afetado negativamente por ela.

De maneira muito preferencial, o inóculo de acordo com a invenção não compreende cisteína sob forma ácida, tal como a cisteína-HCl (cloridrato de L-cisteína de fórmula $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}\cdot\text{HCl}$).

O inóculo de acordo com a invenção se apresenta sob uma forma física particular. Ele se apresenta sob forma de grânulo(s) congelado(s) e/ou liofilizado(s).

Esta forma particular de inóculo é especialmente adaptada à semeadura direta.

A escolha da cisteína particular acima mencionada permite fabricar o inóculo sob estas particularidades, e obter um inóculo particularmente ativo.

A escolha da L-cisteína particular da invenção permite

misturar a referida pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis* e a referida cisteína juntos, para produzir grânulos congelados e/ou liofilizado(s) que compreendem ao mesmo tempo esta cepa de *B. animalis lactis* e esta cisteína nos mesmos grânulos e/ou de um mesmo liofilizado, sem que o crescimento,
5 ou pelo menos o metabolismo, desta cepa de *B. animalis lactis* seja negativamente associado.

Tais resultados não podem ser atingidos utilizando cisteína sob forma ácida, tal como a cisteína-HCl (cloridrato de L-cisteína de fórmula $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{HHCl}$), ao invés e no lugar da L-cisteína base.

10 Os inventores propõem assim um grânulo congelado ou um liofilizado, no qual se encontram ao mesmo tempo células da referida, pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis* e da referida L-cisteína particular. Este grânulo congelado ou liofilizado pode ser qualificado de inóculo de *B. animalis lactis* com ativador integrado. Este grânulo congelado ou liofilizado
15 é um modo de realização preferido da invenção.

Uma alternativa à via da integração do ativador pode consistir em não associar o ativador em um mesmo grânulo ou liofilizado com a cepa de *B. animalis lactis*, mas produzir grânulos congelados ou liofilizava distintos.

20 Pode-se, por exemplo, produzir e combinar juntos, por exemplo sob a forma de mistura ou de associação («kit-of-parts»):

- grânulos congelados que contêm células da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis*, e grânulos congelados distintos contendo a referida L-cisteína particular (= grânulos não integrados, mas
25 combinados); ou

- um liofilizado contendo células da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis*, e um liofilizado contendo a referida L-cisteína particular (=liofilizados não integrados, mas combinados); ou

- grânulos congelados contendo células da referida, pelo

menos uma, cepa de *B. animalis lactis*, e um liofilizado contendo a referida L-cisteína particular, ou inversamente (= combinação de grânulos e de liofilizado(s)); ou ainda

- uma mistura destas alternativas,

5 Estes inóculos são alternativas diretas ao grânulo congelado ou liofilizado integrado, na medida em que consistem em combinar juntos os meios da invenção, mas sob formas físicas distintas.

Estes inóculos são aqui qualificados de «combinações», e entram no campo do presente pedido.

10 A figura 1 é uma ilustração do modo de produção de grânulos integrados de acordo com a invenção, e o modo de produção de grânulos combinados de acordo com a invenção.

A invenção resulta assim da combinação de uma seleção de cisteína particular (de preferência, L-cisteína base) e o desenvolvimento de
15 uma forma física particular (grânulos congelados e/ou liofilizado(s)), que é adaptado especialmente à sementeira direta.

O inóculo de acordo com a invenção é, além disso, adaptado especialmente à estimulação do crescimento das cepas de *B. animalis lactis*. Ele pode não estar adaptado à estimulação de outras espécies ou gêneros de
20 bactérias probióticas.

Para estimular o crescimento das cepas de *B. animalis lactis*, é necessário dispor de um ativador de crescimento que exerce um efeito positivo sobre o crescimento, ou pelo menos sobre o metabolismo, de *B. animalis lactis*, sem, no entanto, exercer um efeito negativo ou deletério sobre
25 a textura, nem na estrutura, nem na qualidade sanitária e gustativa do produto lácteo fermentado obtido.

Este problema é particularmente delicado, quando se trata de produzir produtos lácteos fermentados que, além do *B. animalis lactis*, necessitam de empregar outras bactérias lácticas.

Cada uma das bactérias lácticas empregadas não têm, com efeito, necessariamente todas o mesmo metabolismo, e condições favoráveis a uma espécie ou um gênero não são necessariamente favoráveis a uma outra espécie ou um outro gênero.

5 Assim, pode ser delicado encontrar condições de fermentação láctica que convêm ao conjunto das cepas empregadas.

A este elemento, se acrescenta o fato da fermentação láctica deve responder a complicações de cinética de acidificação bem particular, para chegar a fabricar um produto lácteo fermentado são e de qualidade.

10 É desejável obter um pH de 5,5 tão rapidamente quanto possível, de maneira a limitar os diversos riscos de contaminações. Uma cinética rápida de acidificação vai, no entanto, ao encontro de um bom crescimento e/ou um bom metabolismo de *B. animalis lactis*.

15 O caso dos leites fermentados obtidos por fermentação de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* e, além disso, por fermentação do probiótico *B. animalis lactis*; é particularmente delicado, na medida em que, além da fermentação de *B. animalis lactis*, deve ser efetuada uma fermentação láctica simbiótica que implica pelo menos uma cepa de *Streptococcus thermophilus*, e pelo menos uma cepa de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*.

20 Ora, *B. animalis lactis* é uma espécie com crescimento lento sobre substrato lácteo (tempo de geração da ordem de 1 a 2 horas), enquanto que os fermentos técnicos *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* são com crescimento rápido (tempo de geração da ordem 15 a 30 min).

25 Nestas circunstâncias, é particularmente complexo chegar a dominar o conjunto dos parâmetros.

O inóculo de acordo com a invenção é, conseqüentemente, concebido especialmente para não exercer efeito negativo sobre a fermentação que poderia ser efetuada por cepas de bactérias lácticas ditas técnicas, e notadamente sobre a fermentação simbiótica de *Streptococcus*

thermophilus, e de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

Assim, o inóculo de acordo com a invenção é especialmente adaptado a um emprego no quadro da produção de um leite fermentado que compreende pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis* a título de cepa
5 probiótico, e que é obtido por fermentação de um substrato lácteo por pelo menos uma cepa de *Streptococcus thermophilus*, e pelo menos uma cepa de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, além da fermentação operada por *B. animalis lactis*.

O inóculo de acordo com a invenção responde às diferentes
10 complicações, e permite obter um produto lácteo fermentado com alto valor probiótico, que é de qualidade excepcional.

Colocado isso, o fato de que o inóculo de acordo com a invenção seja otimizado para a situação particularmente complexa colocada pela fermentação simbiótica de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* na presença
15 de uma fermentação de *B. animalis lactis*, não impede evidentemente de utilizá-lo em situações menos complexas, tais como aquela da fermentação de um substrato lácteo que empregaria apenas um gênero ou espécie de bactéria láctica outra que não a *B. animalis lactis*, além da referida pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis*, ou que empregaria apenas cepas de *B. animalis*
20 *lactis*.

Uma das vantagens do inóculo de acordo com a invenção é que ele permite obter uma população da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existirem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*), que é claramente superior àquela obtida nas mesmas condições, mas
25 utilizando um inóculo clássico da mesma cepa de *B. animalis lactis* sem ativador de crescimento, e do mesmo modo naturalmente superior àquela que seria obtida nas mesmas condições, mas utilizando um inóculo da mesma cepa de *B. animalis lactis* e a cisteína-HCl a título de ativador de crescimento.

O inóculo de acordo com a invenção permite assim obter uma

população da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existirem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*), que é de pelo menos $5 \cdot 10^7$ ufc por grama de produto fermentado ao final de fermentação, de preferência de pelo menos 10^8 ufc por grama de produto fermentado ao final da fermentação.

De maneira notável, o inóculo de acordo com a invenção apresenta a vantagem de permitir obter uma população da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existirem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*), que não desce abaixo de $5 \cdot 10^7$ ufc por grama de produto fermentado, após pelo menos 20 dias, de preferência pelo menos 30 dias de conservação do referido produto fermentado a uma temperatura compreendida entre 4 e 11°C, de preferência a uma temperatura compreendida entre 4 e 10°C, muito preferencialmente a uma temperatura compreendida entre 4 e 9°C.

De maneira particularmente notável, o inóculo de acordo com a invenção apresenta a vantagem de permitir obter uma população da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existirem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*), que não desce abaixo 10^8 ufc por grama de produto fermentado, após pelo menos 20 dias, de preferência de pelo menos 30 dias de conservação do produto fermentado a uma temperatura compreendida entre 4 e 11°C, de preferência a uma temperatura compreendida entre 4 e 10°C, muito de preferência a uma temperatura compreendida entre 4 e 9°C: cf. Figuras 8 e 9, ilustrando a manutenção até pelo menos 30 dias de conservação a 10°C da população de *B. animalis lactis* em leites fermentados (*S. thermophilus* - *L. bulgaricus* + *B. animalis lactis*) produzidos com ajuda de um inóculo de acordo com a invenção, por comparação aos leites fermentados de controle, cuja população de *B. animalis lactis* cai rapidamente a contar do 21º dia.

Outra vantagem do inóculo de acordo com a invenção é que

ele se apresenta sob uma forma que é adaptada a um emprego em um contexto industrial.

Com efeito, o inóculo de acordo com a invenção está sob uma forma aperfeiçoada que permite empregá-lo de maneira particular segura e fácil no quadro de uma produção industrial de produto lácteo fermentado.

As doses de ativadores de crescimento e os desvios aceitos podem ser às vezes delicados de dominar perante os sistemas de medidas e de incorporação utilizados para realizar os produtos lácteos fermentados em meio industrial. Por exemplo, um excesso de ativador, se for benéfico para a cepa probiótico, é geralmente muito nefasto para a qualidade do produto lácteo fermentado obtido: pode conferir um gosto não apreciado (por exemplo, gosto de enxofre para cisteína vertida em excesso), pode exercer efeitos negativos ou deletérios sobre a fermentação das cepas técnicas (é, por exemplo, o caso de *S. thermophilus*, quando um excesso cisteína for utilizado). O controle das quantidades de ativador acrescentado apresenta igualmente um interesse no plano sanitário, na medida em que este controle limita as intervenções humanas, e as modificações e adaptações de circuitos industriais, cuja qualidade sanitária deve ser garantida absolutamente. O controle das quantidades de ativador acrescentado apresenta seguramente, do mesmo modo, um interesse econômico.

Pode-se conseqüentemente ocorrer que o especialista disponha de um ativador de crescimento adaptado, mas que encontre dificuldades durante seu emprego em meio industrial, pois o controle da quantidade de ativador acrescentado aparece delicado neste contexto.

O inóculo de acordo com a invenção é, propriamente dito, muito fácil de ser empregado em um contexto industrial, e permite dominar de maneira segura e simples as quantidades de ativador empregadas. O inóculo de acordo com a invenção é conseqüentemente mais fácil de colocar, e permite fabricar de maneira eficaz e segura em meio industrial dos produtos

láceos fermentados que apresentam excelentes umas qualidades de textura, estrutural e gustativa, e que contêm o probiótico *B. animalis lactis* a dose particularmente elevada.

5 O inóculo da invenção é o resultado de um compromisso delicado entre notadamente:

- a exigência de preservar excelentes umas qualidades do produto lácteo fermentado para o consumidor (qualidades de estrutura, de textura, qualidades sanitárias, qualidades gustativas),

10 - o desejo de ainda melhorar o teor de *B. animalis lactis*, a fim de acentuar os efeitos probióticos do produto, e

- a vontade de dispor de um inóculo sob forma aperfeiçoada, que é adaptada especialmente à sementeira direta, e que permite dominar em total segurança e em total simplicidade as quantidades de ativadores acrescentados.

15 O inóculo de acordo com a invenção responde a estes diferentes objetivos.

O inóculo de acordo com a invenção compreende em mistura ou sob a forma de coleção («kit-of-parts»):

- pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis*, e

20 - L-cisteína dita sob forma livre (ou seja, L-cisteína que é não ligada a outros ácidos aminados por ligação peptídica), esta L-Cisteína sob forma livre sendo, além disso, sob uma forma tal que lhe permite obter grânulos e/ou liofilizado(s) que são tais que o pH da solução obtida após:

o descongelamento do(s) referido(s) grânulo(s), e/ou

25 o ressolubilização do(s) referido(s) liofilizado(s) em uma proporção que vai de 1 a 2 grama(s) de liofilizado(s) para 8 a 10 ml de H₂O, seja pelo menos igual a 4.

De preferência, este pH não ultrapassa o pH de 8.

Para este efeito, escolher-se-á de preferência uma L-Cisteína

livre que está sob uma forma tal que apresenta um pH que está acima de 4 quando é colocada em solução. Por exemplo, uma solução que contém 1,25 gramas desta forma de cisteína para 50 ml de H₂O apresenta um pH que vai de 4,5 a 5,5.

5 Um exemplo preferido de tal forma cisteína é a L-Cisteína comumente denominada L-cisteína base (ou L-cisteína sob forma base). Sob forma reduzida, a L-Cisteína base tem por fórmula HSCH₂CH(NH₂)CO₂H.

As quantidades de L-cisteína particular de acordo com a invenção e células de *B. animalis lactis* contidas no inóculo da invenção são
10 repartidas em estruturas físicas sólidas, a saber, grânulos congelados e/ou um (uns) liofilizado(s).

A referida cisteína e a referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* podem estar contidas juntas em uma mesma estrutura sólida, ou estarem presentes em estruturas sólidas distintas. Estas estruturas sólidas
15 distintas podem elas próprias serem condicionadas de maneira separada, mas em coleção, ou ainda estarem em mistura.

Naturalmente, uma mistura de estrutura sólida comum, contendo ao mesmo tempo a L-cisteína particular de acordo com a invenção e células de *B. animalis lactis*, e estruturas sólidas distintas poderia ser
20 realizada.

A referida cisteína e a referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* podem conseqüentemente estar:

- agrupadas em mesmos grânulos congelados e/ou ou um mesmo liofilizado, e/ou
- 25 - separadas, mas em coleção («kit-of-parts»), em grânulos congelados distintos e/ou liofilizado(s) distintos.

Assim, e de acordo com um modo vantajoso de realização da invenção, a totalidade ou parte da L-cisteína particular e de células de *B. animalis lactis* podem estar juntas em mesmos grânulos congelados, ou em

um mesmo liofilizado. O inóculo da invenção compreende pelo menos então um grânulo congelado e/ou um liofilizado, que contém ao mesmo tempo a L-cisteína particular de acordo com a invenção e as células de *B. animalis lactis*.

5 De maneira preferida, é o conjunto das quantidades de L-cisteína particular e de células de *B. animalis lactis* contidas no inóculo que são juntas em mesmos grânulos congelado, ou em um mesmo liofilizado.

A totalidade ou parte da referida L-cisteína particular de acordo com a invenção e células de *B. animalis lactis* podem ser separadas fisicamente, mas em coleção («kit-of-parts»), em grânulos congelados
10 distintos e/ou liofilizado(s) distintos. O inóculo da invenção compreende então:

- pelo menos dois grânulos congelados, ou
- pelo menos dois liofilizados distintos, ou
- pelo menos um granulado congelado e pelo menos um
15 liofilizado,

que cada um contém seja a cisteína particular de acordo com a invenção, seja células de *B. animalis lactis*, de modo que, para cada um destes pares de entidades físicas (grânulo + grânulo; ou liofilizado + liofilizado distinto; ou grânulo + liofilizado):

- 20 - uma das duas entidades físicas contém a totalidade ou parte da L-cisteína particular, sem conter células de *B. animalis lactis*, e
- a outra das duas entidades físicas que contém células de *B. animalis lactis*, sem conter a L-cisteína particular.

Naturalmente, o conjunto da quantidade de L-cisteína
25 particular de acordo com a invenção e o conjunto das células de *B. animalis lactis* contidos no inóculo podem assim estar contidos, ou se apresentar sob a forma de grânulo(s) distinto(s) e/ou liofilizado(s) distinto(s).

O inóculo de acordo com a invenção pode conseqüentemente compreender, ou ser constituído dos seguintes elementos:

a) grânulos congelados contendo L-cisteína particular de acordo com invenção e as células de *B. animalis lactis*,

b) liofilizado contendo L-cisteína particular de acordo com invenção e as células de *B. animalis lactis*,

5 c) grânulos congelados contendo L-cisteína particular de acordo com a invenção, mas não células de *B. animalis lactis*, e grânulos congelados que contêm células de *B. animalis lactis*, mas não L-cisteína particulares de acordo com a invenção,

10 d) liofilizado contendo L-cisteína particular de acordo com a invenção, mas não células de *B. animalis lactis*, e liofilizado que contém células de *B. animalis lactis*, mas não L-cisteína particular de acordo com invenção,

15 e) grânulos congelados contendo L-cisteína particular de acordo com a invenção, mas não células de *B. animalis lactis*, e liofilizado que contém células de *B. animalis lactis*, mas não L-cisteína particular de acordo com a invenção,

20 f) liofilizado contendo L-cisteína particular de acordo com a invenção, mas não células de *B. animalis lactis*, e grânulos congelados que contêm células de *B. animalis lactis*, mas não L-cisteína particular de acordo com a invenção,

g) ou de uma mistura de pelo menos duas das formulações apresentadas sob a) a f) acima.

25 O inóculo de acordo com a invenção contém cisteína dita sob forma livre (ou seja não ligada a outros ácidos aminados por ligação peptídica), que resulta de uma seleção particular operada pelos inventores.

Com efeito, a referida cisteína sob forma livre é uma L-cisteína livre que, além disso, está sob uma forma tal que permite obter grânulos e/ou liofilizado(s) que são tais que o pH da solução obtida após:

- descongelamento do(s) referido(s) grânulo(s) (por exemplo,

colocando os grânulos em banho-maria a 37°C durante 3 min sob agitação manual), e/ou

- ressolubilização do(s) referido(s) liofilizado(s) em uma proporção que vai de 1 a 2 grama(s) de liofilizado(s) para 8 a 10 ml de H₂O (por exemplo, com reidratação durante 30 min a 25°C sob agitação magnética),

é pelo menos igual a 4.

Para este efeito, escolher-se-á de preferência uma L-Cisteína sob uma forma tal que o pH de uma solução constituída de 1 a 1,5 grama(s) desta cisteína em 50 a 100 ml de H₂O é pelo menos igual a 4.

Um exemplo de uma cisteína apropriada é a L-Cisteína geralmente denominada L-cisteína base, cuja fórmula sob forma reduzida é HSCH₂CH(NH₂)CO₂H.

Um exemplo de uma cisteína não apropriada é a cisteína-HCl (cloridrato de cisteína, ou cloridrato monoidratado de cisteína).

De preferência, nenhum dos compostos utilizados para fabricar o inóculo de acordo com a invenção não está sob forma cloroidratada.

A L-cisteína particular de acordo com a invenção que está contida no inóculo da invenção não é uma cisteína ácida, tal como o cloridrato de L-cisteína (HSCH₂CH(NH₂)CO₂H•HCl) ou o cloridrato de monoidratado de L cisteína (HSCH₂CH(NH₂)CO₂H•HCl•H₂O).

O cloridrato monoidratado de L-cisteína não é uma cisteína particular de acordo com a invenção, pois uma solução constituída de 1,0 g de cloridrato monoidratado de L-cisteína em 100 ml de H₂O tem um pH de 1, 5 a 2,0.

Assim, o descongelamento de grânulos congelados, ou a ressolubilização de um liofilizado, que teria (teriam) sido produzido(s) a partir de uma cisteína que não seria uma cisteína particular de acordo com a invenção, conduziria a uma solução cujo pH é muito ácido, particularmente

cujo pH é inferior a 4, geralmente inferior a 3,5.

A maior parte de cisteínas sob forma muito ácida é cisteínas sob a forma de sais, tais como o cloridrato de L-cisteína, ou o cloridrato monoidratado de L-cisteína. O ou os íons que participam neste sal se encontram no granulado congelado ou liofilizado. A presença deste ou destes íons pode conseqüentemente constituir um indicador, às vezes, um marcador da utilização de uma cisteína que é combinada a uma entidade ácida (a qual tem geralmente por função aumentar a solubilizada da cisteína). É, por exemplo, o caso com os íons cloro contidos no cloridrato de L-cisteína, ou o cloridrato monoidratado de L-cisteína. Com efeito, se uma cisteína ácida do cloridrato de L-cisteína, ou do cloridrato de monoidratado de L-cisteína, for utilizado, pode-se constatar que o grânulo ou o liofilizado contém uma forte quantidade de cloreto (Cl), já que o cloridrato monoidratado de L-cisteína contém mais de 19% de cloreto, e que a L-cisteína base contém em geral menos de 0,05%, mais particularmente menos de 0,040%. A presença forte de cloreto no grânulo ou no liofilizado pode assim constituir um marcador indireto da utilização de uma cisteína que não é cisteína base. Assim, a forma da cisteína utilizada em um inóculo de acordo com a invenção trará geralmente menos de 60 microgramas de íons cloro por grama de grânulos com 16-17% de material seco.

Isto sendo dado, o primeiro critério que se aplica é aquele do pH. A medida do pH constitui, com efeito, o critério direto de detecção da presença de uma cisteína particular de acordo com a invenção: o pH dos grânulos descongelados, ou do liofilizado ressolubilizado, é então, pelo menos, igual a 4. É em geral, pelo menos igual, a 5, por exemplo, entre 5 e 6,5. De preferência, este pH não ultrapassa o pH de 8.

Um pH que é pelo menos igual a 4 e no máximo igual a 8 não é um estressante para *B. animalis lactis*. *B. animalis lactis* pode então ser colocado em mistura na solução de cisteína sem sofrer stress, e ser formulado

em grânulos congelados ou liofilizado que integra cisteína e células de *B. animalis lactis* em uma estrutura física sólida. O inóculo de *B. animalis lactis* resultante contém então células de *B. animalis lactis* que estão em bom estado fisiológico e/ou metabólico, e que responde rapidamente à ativação exercida
5 pela cisteína.

Um grânulo congelado ou um liofilizado «integrado» da invenção, que contém ao mesmo tempo células de *B. animalis lactis* e a L-cisteína particular de acordo com a invenção, é, conseqüentemente, um inóculo de *B. animalis lactis* particularmente aperfeiçoado, na medida em
10 que, chega a integrar um ativador de *B. animalis lactis* na sua estrutura, sem, no entanto, alterar o estado fisiológico e/ou o metabolismo das células de *B. animalis lactis*.

A seleção da L-cisteína particular de acordo com a invenção permite obter grânulos e/ou liofilizados que são mais eficazes do que seriam
15 grânulos e/ou liofilizados formulados a partir de L-cisteína sob forma muito ácida, tal como o cloridrato de L-cisteína.

Igualmente é esta seleção que permite integrar a cisteína de maneira eficaz nos grânulos congelados, ou em um liofilizado. Com efeito, quando se utiliza a cisteína sob forma muito ácida, tal como o cloridrato de L-cisteína, para formular um grânulo congelado ou um liofilizar que
20 compreende ao mesmo tempo cisteína-HCl e células de *B. animalis lactis*, o grânulo integrado ou o liofilizado integrado resultante é um inóculo pouco eficaz de *B. animalis lactis*, comparado com o mesmo grânulo ou liofilizado obtido a partir de L cisteína particular de acordo com a invenção.

De acordo com um modo preferido de realização da invenção, o inóculo da invenção compreende, conseqüentemente, cisteína muito ácida, e mais particularmente não cloridrato de L-cisteína, e/ou não é fabricada a partir
25 de tal cisteína.

O inóculo de acordo com a invenção também não é destinado a

compreender a cistina. De preferência, não se acrescentará conseqüentemente cistina no inóculo da invenção. No entanto, traços de cistina podem ser aí encontrados, mas isso seria o fato, por exemplo, de uma oxidação da cisteína contida no inóculo.

5 Vantajosamente, a referida L-cisteína particular de acordo com a invenção está presente no inóculo em uma quantidade que vai:

- de 1 grama a 1.10^{14} *ufc* da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existirem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*),

10 - de 1 grama a $3,5.10^{10}$ *ufc* da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existirem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*);

e/ou em uma quantidade que vai:

15 - a 0,01 miligrama por milhões de *ufc* da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existirem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*),

- a 30 miligramas por milhões de *ufc* da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existirem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*).

20 No presente pedido, todas as massas cisteína são calculadas sobre a base de cisteína de fórmula $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$.

De preferência, a referida L-cisteína particular de acordo com a invenção está presente no referido inóculo em uma quantidade que vai:

25 - de 1 grama a $0,2.10^{14}$ *ufc* da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existirem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*).

- de 1 grama a 10.10^{10} *ufc* da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existirem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*);

e/ou em uma quantidade que vai:

- a 0,05 miligrama por milhões de *ufc* da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existirem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*),

5 - a 10 miligramas por milhões de *ufc* da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existirem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*).

De acordo com um modo particular de realização da invenção, a referida L-cisteína particular de acordo com a invenção está presente no referido inóculo em uma quantidade que vai de 4,90 mg a 144 mg para $5 \cdot 10^9$ a $5 \cdot 10^{11}$ *ufc* da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis*.

De preferência, a referida L-cisteína particular de acordo com a invenção está presente no referido inóculo em uma quantidade que vai de 25 a 50 mg, mais de preferência, de 30 a 40 mg, ainda mais preferencialmente de 15 31 a 39 mg, por exemplo, cerca de 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 mg, muito preferencialmente de 35 a 37 mg, por exemplo cerca de 35, 36, 37 mg, de maneira particularmente preferida, de cerca de 36,9 mg, para $5 \cdot 10^9$ a $5 \cdot 10^{11}$ *ufc* da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis*.

De preferência, o número de *ufc* de *B. animalis lactis* é de 20 $5 \cdot 10^9$ a $5 \cdot 10^{11}$ *ufc*, mais de preferência, de $2 \cdot 10^{10}$ a $5 \cdot 10^{11}$ *ufc* de *B. animalis lactis*, muito de preferência, de $2 \cdot 10^{10}$ a $1 \cdot 10^{11}$ *ufc* de *B. animalis lactis*, ainda mais de preferência, de $2 \cdot 10^{10}$ a $7 \cdot 10^{10}$ *ufc* de *B. animalis lactis*.

Vantajosamente, 1 grama de grânulos conformes com a invenção, que compreenderiam a 16-17% de material seco (material seco a 25 105°C durante pelo menos 40 min), compreende de $5 \cdot 10^9$ a $5 \cdot 10^{11}$ *ufc* da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis*.

Vantajosamente, 1 grama de grânulos de acordo com a invenção, que compreenderiam 16-17% de material seco (material seco a 105°C durante pelo menos 40 min), compreende de 4,90 mg a 144 mg da L-

cisteína particular de acordo com a invenção, de preferência de L-cisteína base.

Vantajosamente, uma quantidade de 160 a 170 miligramas de um liofilizado de acordo com a invenção compreende de 5.10^9 a 5.10^{11} *ufc* da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis*.

Vantajosamente, uma quantidade de 160 a 170 miligramas de um liofilizado de acordo com a invenção compreende de 4,90 mg a 144 mg da L-cisteína particular de acordo com a invenção.

Para numerar as colônias que formam unidade (*ufc*) de *B. animalis lactis*, pode-se utilizar qualquer técnica que o especialista achasse apropriada, por exemplo, o método de numeração de bifidobactérias descrito em Grand *et al.* 2003 (Eur. Food Res. Technol. 217: 90-92). De preferência, utiliza-se o método descrito em S. N. Thitaram, G. R. Siragusa e A. Hinton, 2005 (Jr Letters in Applied Microbiology, - Volume 41 página 355 – outubro de 2005; «*Bifidobacterium- selective isolation and enumeration from chicken caeca by a modified oligosaccharide antibiotic-selective agar medium*»).

Para dosar a cisteína contida em um líquido, pode-se utilizar qualquer técnica que o especialista achasse apropriado, por exemplo, a cromatografia em fase gasosa acoplada a uma espectrometria de massa, ou uma cromatografia líquido de alto desempenho acoplado a uma detecção fluorimétrica. Pode-se igualmente dosar a cisteína através de um analisador de ácidos aminados tais como o L-8800 *High Speed Amino Acid Analyzer* (Hitachi High Technologies).

De preferência, o inóculo de acordo com a invenção não compreende mais de 0,5% (p/p) de fermento, extrato de fermento ou autolisado de fermento.

De preferência, o inóculo de acordo com a invenção não compreende mais de 0,5% (p/p) de fermento, extrato de fermento ou autolisado de fermento. Muito preferencialmente, o referido inóculo não

contém fermento, extrato de fermento ou autolisado de fermento.

Vantajosamente, a invenção permite formular um inóculo de *B. animalis lactis* que é bastante ativo, e que gera uma população de *B. animalis lactis* que se mantém no tempo (durante a conservação do produto lácteo fermentado à temperatura refrigerada), sem que se tenha que utilizar conservador no inóculo, e sem que se tenha acrescentado um conservador no substrato lácteo, ou no produto lácteo fermentado.

Graças à invenção, a população de *B. animalis lactis* se encontra no produto lácteo fermentado em um estado fisiológico e/ou metabólico particularmente são que lhe permite se manter em um forte nível.

O inóculo da invenção compreende pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis*, por exemplo, a cepa I-2494 ou a cepa BB12® de Chr. Hansen.

O inóculo da invenção pode certamente compreender várias cepas de *B. animalis lactis*, por exemplo, a cepa I-2494 e a cepa BB12® de Chr. Hansen.

O inóculo de acordo com a invenção pode, além disso, compreender pelo menos uma cepa de bactéria láctica outra que *B. animalis lactis*.

A referida pelo menos outra cepa de bactéria láctica pode estar presente nos grânulos ou liofilizado(s) que contêm células de *B. animalis lactis* e/ou a L-cisteína particular de acordo com a invenção.

A referida pelo menos outra cepa de bactéria láctica pode estar presente em uma estrutura física distinta daquela que contém as células de *B. animalis lactis*. Esta estrutura física distinta pode, por exemplo, ser uma estrutura sólida, tal como grânulos congelados ou um liofilizado, que estão misturados com os grânulos e/ou liofilizado(s) de *B. animalis lactis* e L-cisteína particular de acordo com a invenção, ou que são separados, mas em coleção («kit-of-parts»).

Esta pelo menos outra cepa de bactéria láctica pode, por exemplo, estar presente sob a forma de grânulos congelados, ou de um liofilizado, que são (leste) distinto (distinto) dos grânulos ou liofilizado(s) de *B. animalis lactis* e cisteína particular de acordo com a invenção.

5 Esta pelo menos outra cepa de bactéria láctica pode ser uma cepa de *Bifidobacterium*, ou uma cepa de um gênero diferente.

Esta cepa de gênero diferente pode ser uma cepa com função probiótica, por exemplo, pelo menos uma cepa escolhida das cepas de *Lactohacillus acidophilus*, *Mactobacillus thamosus*, *Lactobacillus casei*.

10 Esta cepa de gênero diferente pode ser uma cepa com função técnica, tal como *S. thermophilus* e/ou *L. bulgaricus*.

Vantajosamente, o referido inóculo de acordo com a invenção compreende, além de grânulo(s) e/ou liofilizado(s) de *B. animalis lactis* e L-cisteína particular, um inóculo de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*, por exemplo, sob a forma de grânulo(s) congelado(s) e/ou liofilizado(s), adaptados à sementeira direta.

De maneira preferencial, o inóculo de acordo com a invenção compreende várias cepas além da *B. animalis lactis*, por exemplo, pelo menos dois, pelo menos três, pelo menos quatro cepas além da *B. animalis lactis*.

20 Vantajosamente estas outras cepas são pelo menos uma cepa de *S. thermophilus* (por exemplo, a cepa I-1630 disponível junto à CNCM), e pelo menos duas cepas de *L. bulgaricus* (por exemplo, as cepas I-1632 e I-1519 disponíveis junto à CNCM). Tal inóculo pode se apresentar sob forma de uma mistura ou uma coleção «kit-of-parts» de grânulos congelados e/ou liofilizado(s) contendo *B. animalis lactis* e L-cisteína particular de acordo com a invenção, e de grânulos congelados e/ou liofilizado(s) que contém *S. thermophilus* e/ou *L. bulgaricus*. O conjunto é, então especialmente, adaptado à sementeira direta de um substrato lácteo, com o propósito de sua transformação por fermentação láctica acidificante simbiótica *S.*

thermophilus-L. bulgaricus e por fermentação de *B. animalis lactis*, em um leite fermentado que tem elevado valor probiótico, e que mantém seu elevado valor probiótico durante sua conservação em meio refrigerado.

5 O presente pedido se refere igualmente a um grânulo integrado de acordo com a invenção como tal, bem como a um liofilizado integrado de acordo com a invenção como tal.

10 Como indicado e descrito acima, e/ou em parte exemplos abaixo, um grânulo ou liofilizado integrado de acordo com a invenção compreende pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis* e a L-cisteína particular de acordo com a invenção, nas doses e/ou proporções indicadas. De preferência, tal grânulo ou liofilizado não compreende cisteína sob forma muito ácida, tal como o monoclorato de L cisteína.

15 O presente pedido se refere assim grânulo congelado, que compreende pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis*, e a L-cisteína que está não ligada a outros ácidos aminados por ligação peptídica, a referida L-cisteína sendo sob uma forma tal que o pH da solução obtida após descongelamento do(s) referido(s) grânulo(s) é pelo menos igual a 4, geralmente superior a 5.

20 O presente pedido se refere assim a um liofilizado, que compreende pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis*, e L-cisteína que está não ligada a outros ácidos aminados por ligação peptídica, a referida L-cisteína sendo sob uma cisteína sob uma forma tal que o pH da solução obtida após ressolubilização do(s) referido(s) liofilizado(s) em uma proporção que vai de 1 a 2 grama(s) de liofilizado(s) para 8 a 10 ml de H₂O, é pelo menos
25 igual a 4, geralmente superior a 5.

De preferência, o pH de grânulo ou liofilizado é inferior a 8 (pH da solução obtida após descongelamento do grânulo, ou ressolubilização liofilizado).

A invenção igualmente se refere às utilizações do inóculo de

acordo com a invenção. A invenção se refere, mais particularmente, as suas utilizações no quadro de uma fermentação láctica acidificante, ainda mais particularmente a suas utilizações no quadro da fabricação de produtos lácteos fermentados destinados ao consumo humano.

5 A invenção se refere assim a qualquer processo que emprega pelo menos um inóculo e/ou pelo menos um grânulo ou liofilizado de acordo com a invenção.

A invenção visa mais particularmente um processo de estimulação do crescimento e/ou do metabolismo de *B. animalis lactis* sobre substrato lácteo, que emprega pelo menos um inóculo e/ou pelo menos grânulo e/ou pelo menos um liofilizado de acordo com a invenção.

10

Este processo de estimulação apresenta a vantagem de estimular *B. animalis lactis* de maneira muito eficaz. Como apresentado acima, e como ilustrado abaixo, o processo de estimulação de acordo com a invenção permite produzir uma população de *B. animalis lactis* cujo metabolismo e/ou o crescimento permitem uma manutenção de células vivas de *B. animalis lactis* durante o tempo.

15

Para empregar este processo, traz-se o referido inóculo em doses e/ou em proporções tais como indicadas acima e/ou descritas nos exemplos e nas figuras que seguem.

20

Vantajosamente, traz-se o referido inóculo e/ou grânulo e/ou liofilizado de acordo com a invenção em quantidades que trazem ao substrato lácteo:

- 5 a 20 mg cisteína por L de substrato lácteo, de preferência, de 6 a 15 mg/l, mais de preferência de 7 a 11 mg/l, e

25

- 10^9 a 10^{11} ufc de *B. animalis lactis* por L de substrato, de preferência, de $0,4 \cdot 10^{10}$ a $1 \cdot 10^{11}$ ufc de *B. animalis lactis*, mais preferencialmente, de $0,4 \cdot 10^{10}$ a $1,2 \cdot 10^{10}$ ufc de *B. animalis lactis*, muito preferencialmente, de $0,4 \cdot 10^{10}$ a $1 \cdot 10^{10}$ ufc de *B. animalis lactis*.

O substrato inóculo de preferência é mantido em condições de temperatura e de atmosfera favoráveis ao metabolismo de *B. animalis lactis*, por exemplo, de 37°C a 42°C, (em um recipiente fechado).

5 A invenção visa igualmente um processo de produção de um produto lácteo fermentado, de preferência de um produto lácteo obtido por fermentação láctica, cuja fermentação láctica compreende pelo menos a fermentação simbiótica *S. thermophilus* - *L. bulgaricus*, além da fermentação operada por *B. animalis lactis*

10 O processo da invenção compreende o emprego de pelo menos um inóculo e/ou pelo menos um grânulo e/ou pelo menos um liofilizado de acordo com a invenção. O produto lácteo fermentado obtido é um produto lácteo fermentado com elevado valor probiótico, pois contém um forte teor de *B. animalis lactis*, e conserva um teor elevado durante conservação em atmosfera refrigerada.

15 Este processo de produção apresenta a vantagem de ativar e/ou estimular *B. animalis lactis* de maneira muito eficaz. Apresenta igualmente a vantagem de não exercer efeito negativo sobre a simbiose *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*. Como acima apresentado, e como abaixo periódico ilustrado, o processo de acordo com produção a invenção permite produzir uma
20 população de *B. animalis lactis* cujo metabolismo e/ou o crescimento permitem uma manutenção de células vivas de *B. animalis lactis* durante o tempo.

25 Para empregar este processo, traz-se o referido inóculo em doses e/ou proporções tais como indicadas acima e/ou descritas nos exemplos e nas figuras que seguem.

Vantajosamente, traz-se o referido inóculo e/ou grânulo e/ou liofilizado de acordo com a invenção em quantidades que trazem ao substrato lácteo:

- 5 a 20 mg cisteína por L de substrato lácteo, de preferência,

de 6 a 15 mg/l, mais preferencialmente de 7 a 11 mg/l, e

- 10^9 a 10^{11} ufc de *B. animalis lactis* por L de substrato, de preferência, de $0,4 \cdot 10^{10}$ a $1 \cdot 10^{11}$ ufc de *B. animalis lactis*, mais preferencialmente, de $0,4 \cdot 10^{10}$ a $1,2 \cdot 10^{10}$ ufc de *B. animalis lactis*, muito preferencialmente, de $0,4 \cdot 10^{10}$ a $1 \cdot 10^{10}$ ufc de *B. animalis lactis*.

Doses de 0,05 g a 1 grama de grânulos integrados de acordo com a invenção, por exemplo, de cerca de 0,2 g de grânulos integrados de acordo com a invenção, são exemplos de doses apropriadas para 1 litro de substrato lácteo.

- 10 O substrato inoculado é mantido, de preferência, em condições de temperatura e de atmosfera favoráveis ao metabolismo de *B. animalis lactis*, por exemplo, de 37°C a 42°C, (em um recipiente fechado).

- A referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* tem o papel de cepa probiótica. Sendo isto, esta pelo menos cepa de *B. animalis lactis* deve poder, ela também, efetuar uma fermentação acidificante do substrato lácteo. A referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* conseqüentemente não é simplesmente adicionada no substrato ou no produto lácteo sem que lhe permita efetuar uma fermentação acidificante, como seria para um simples aditivo.

- 20 Vantajosamente, o processo de produção de produto lácteo fermentado pode compreender o emprego de pelo menos uma cepa além da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis*.

Esta outra cepa é, de preferência, uma cepa de bactéria láctica.

- A referida pelo menos uma outra cepa de bactéria láctica tem notadamente por função efetuar uma fermentação láctica acidificante. Ela é, conseqüentemente, inoculada no substrato lácteo de modo a poder conduzir uma fermentação láctica acidificante, ou seja, um momento e quantidades que lhe permitem efetivamente efetuar uma fermentação láctica acidificante.

O processo de fermentação da invenção corresponde

conseqüentemente a uma fermentação mista efetuada pela referida, pelo menos uma, cepa de bactéria láctica e pela referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis*, e não a um simples processo de fermentação láctico no qual *B. animalis lactis* seria acrescentado como um simples aditivo sem ação fermentar detectável.

A referida, pelo menos uma, cepa de bactéria láctica e a referida pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis* se encontram conseqüentemente juntas no substrato lácteo.

De acordo com um aspecto vantajoso da invenção, o processo de produção pode assim não ser um processo dito com duas etapas («two-step process»): a adição da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* e eventuais outras cepas de bactérias lácticas pode ser realizadas ao mesmo tempo, ou a qualquer meio sensível na mesma etapa do processo, a saber, no início do processo, tendo que esperar e controlar apenas a fermentação efetuada por uma das cepas cheguem a certa fase, para decidir acrescentar a ou as outras cepas.

A fermentação do substrato lácteo é efetuada a uma temperatura apropriada às cepas empregadas, e efetuada geralmente a uma temperatura compreendida entre 36°C e 42°C.

Esta fermentação é geralmente efetuada até a obtenção de um pH compreendido entre 4,8 e 4,2.

O processo de produção de produto lácteo fermentado de acordo com a invenção pode, além disso, compreender uma ou várias outras etapas, por exemplo, uma ou várias outras etapas escolhidas dentre as etapas clássicas de produção de produto lácteo fermentado referido.

Pode-se, por exemplo, se tratar de uma ou várias etapas entre as seguintes etapas:

- a preparação de um substrato lácteo,
- o tratamento térmico do substrato lácteo (tratamento térmico

pelo menos equivalente à pasteurização, por exemplo, 95°C durante 5 min),

- uma ou várias inoculações do substrato lácteo,

- a condução de pelo menos uma fermentação láctica do substrato inóculo nas condições adaptadas às cepas inoculadas (até um pH de 5 4,8 a 4,2 geralmente),

- eventualmente a adição de aromas, frutas, adoçantes, corantes, conservantes,

- eventualmente, nivelamento ou revolvimento do produto fermentado,

- 10 - o acondicionamento do produto fermentado, por exemplo, em recipientes herméticos,

- a conservação do produto lácteo fermentado em meio refrigerado.

O inóculo de acordo com a invenção permite assim obter uma 15 população da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existirem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*), que é de pelo menos $5 \cdot 10^7$ *ufc* por grama de produto fermentado ao final de fermentação, de preferência de pelo menos 10^8 *ufc* por grama de produto fermentado ao final de fermentação.

20 De maneira notável, o inóculo de acordo com a invenção apresenta a vantagem de permitir obter uma população da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existirem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*), que não desce abaixo $5 \cdot 10^7$ *ufc* por grama de produto fermentado, após pelo menos 20 dias, de preferência, pelo menos 30 25 dias de conservação do referido produto fermentado a uma temperatura compreendida entre 4 e 11°C, de preferência a uma temperatura compreendida entre 4 e 10°C, muito preferencialmente a uma temperatura compreendida entre 4 e 9°C.

De maneira particularmente notável, o inóculo de acordo com

a invenção apresenta a vantagem de permitir obter uma população da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existirem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*), que não desce abaixo 10^8 ufc por grama de produto fermentado, após pelo menos 20 dias, de preferência de pelo menos 30 dias de conservação do referido produto fermentado a uma temperatura compreendida entre 4 e 11°C, de preferência a uma temperatura compreendida entre 4 e 10°C, muito preferencialmente a uma temperatura compreendida entre 4 e 9°C: cf. Figuras 8 e 9, ilustrando a manutenção até a pelo menos 30 dias de conservação a 10°C da população de *B. animalis lactis* em leites fermentados produzidos com ajuda de um inóculo de acordo com a invenção (*S. thermophilus*-*L. bulgaricus* + *B. animalis lactis*), por comparação aos leites fermentados testemunha, cuja população de *B. animalis lactis* cai rapidamente a contar do 21º dia.

No presente pedido, as massas de produto lácteo fermentado se entendem como sendo a massa da parte láctea do produto lácteo fermentado.

O presente pedido se refere igualmente ao produto lácteo fermentado como tal.

Tal produto apresenta uma população de *B. animalis lactis* que se mantém acima daquelas observadas nos produtos da técnica anterior, mesmo após, no mínimo, 20 dias, de preferência, pelo menos, 30 dias de conservação do produto fermentado a uma temperatura compreendida entre 4 e 11°C, de preferência a uma temperatura compreendida entre 4 e 10°C, muito preferencialmente a uma temperatura compreendida entre 4 e 9°C.

Sua composição difere então necessariamente dos produtos da técnica anterior.

O presente pedido se refere então a um produto lácteo fermentado, que é susceptível de ser obtido por fermentação láctica de um substrato lácteo por pelo menos um inóculo de acordo com a invenção até a um pH geralmente compreendido entre 4,8 e 4,2. De preferência, este inóculo

é sob forma de grânulos congelados integrados e/ou de um liofilizado integrado de acordo com a invenção (inóculo no qual a L-cisteína particular é integrada ao fermento *B. animalis lactis*). Vantajosamente, este inóculo pode, além disso, compreender pelo menos uma cepa de *S. thermophilus* e/ou pelo menos uma cepa de *L. bulgaricus*.

No presente pedido, o acrônimo CNCM designa a Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM; Instituto Pasteur; 25, rue du Docteur Roux; F-75724 PARIS CEDEX 15). As cepas depositadas junto à CNCM trazem um número que começa por «I», tal como «I-2494» (cepa de *B. animalis lactis*), «I-1630» (cepa de *S. thermophilus*), «I-1632» ou «I-1519» (cepas de *L. bulgaricus*).

O termo «compreendendo», com o qual «incluindo» ou «contendo» é sinônimo, é um termo aberto, e não exclui a presença de um ou vários elemento(s), ingrediente(s) ou etapa(s) de método adicional(s) que não seria (seriam) explicitamente indicado(s), enquanto o termo «consistindo» ou «constituído» é um termo fechado, que exclui a presença de qualquer outro elemento adicional, etapa, ou ingrediente que não for exposto explicitamente. O termo «consistindo essencialmente» ou «essencialmente constituído» é um termo parcialmente aberto, que não exclui a presença de um ou vários elemento(s), ingrediente(s) ou etapa(s) adicional(s), na medida em que este(s) elemento(s), ingrediente(s) ou etapa(s) adicional(s) não afeta(m) materialmente as propriedades básicas da invenção.

Conseqüentemente, o termo «compreendendo» (ou «compreende(compreendem)») inclui os termos «consistindo», «constituído», assim como os termos «consistindo essencialmente» e «essencialmente constituído».

O conteúdo de cada um dos documentos, obras, ou publicações que são citados no presente pedido é incorporado por referência.

Os exemplos que segue são dados a título meramente

ilustrativo, e não limitam de nenhum modo a invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1: A utilização de cisteína-HCl não é adaptada à fabricação de grânulos ditos «integrados» que compreenderiam ao mesmo tempo cisteína e

5 *B. animalis lactis*

Material e método:

Neste exemplo, segue-se o princípio de fabricação de grânulos apresentado na figura 2.

As cepas probióticas utilizadas neste exemplo são as seguintes:

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

- *Bifidobacterium animalis lactis* cepa I-2494 disponível junto à CNCM (data de depósito junto à CNCM = 20 de Junho de 2000); cf. pedido internacional WO 02/02800 depositado em 4 de Julho de 2001 em nome de
15 Compagnie Gervais Danone, bem como as contrapartidas nacionais e regionais deste pedido internacional, mais particularmente, no que se refere às contrapartidas US deste pedido internacional, ver notadamente a patente US 7 008 785 B2.

20 Dependendo do caso, as cepas são descongeladas antes de utilização.

A cisteína utilizada é a cisteína-HCl, que habitualmente é utilizada a título de aporte em cisteína, em função de sua excelente solubilidade (cerca de 110 g a 100 g de H₂O a 20°C).

25 A cisteína-HCl é do hidrocloreto monoidratado de L-cisteína (ou, monoclóridrato monoidratado de ácido (R)-2-amino-3-mercaptopropiônico).

Ela tem por fórmula C₃H₇NO₂S•HCl•H₂O (ou, L-cisteína•HCl•H₂O). Seu número CAS é 7048-04-6; tendo uma massa molar de 175,63.

A cisteína-HCl está disponível no comércio, por exemplo, junto à Ajinomoto Aminoscience LLC, Raleigh NC 27610, USA.

Processo de produção de grânulos (cf. Figura 2):

- 50 gramas de cada cepa de *B. animalis lactis* são misturados

5 a:

- 15 gramas de cisteína-HCl a 325 g/L (grânulos integrados G4I Cis-HCl), ou a

- 15 gramas de água (grânulos testemunha I-2494 T e BB12 T).

10

A mistura se faz sob agitação a fim de efetivamente incorporar a solução de cisteína-HCl (ou a água no caso das testemunhas).

15

A formação de grânulos congelados se faz por gotejamento da mistura em nitrogênio líquido. Um dispositivo compreendendo várias agulhas seringa, conectadas via um tubo com uma bomba peristáltica, é alimentado em mistura e deixa cair as gotas formadas na saída das agulhas em uma bacia isotérmica preenchida de nitrogênio líquido.

20

Obtém-se assim grânulos congelados de fermento probiótico G4I Cis-HCl (grânulos de *B. animalis lactis* 1-2494 ou BB12®, contendo a cisteína-HCL), e os grânulos testemunha contendo água no lugar da cisteína-HCl.

Preparação dos mix lácteos (= substratos lácteos):

Os mix lácteos são compostos dos seguintes ingredientes: leite desnatado com 0% de materiais graxos, nata com 40% de materiais graxos e pó de leite desnatado (PLE) com 33% de proteínas.

25

Inicialmente, todos os ingredientes são associados juntos a fim de padronizar o leite com uma taxa de proteínicos (TP) de 4,4%, uma taxa de materiais graxos (MG) de 3,5% e taxas de materiais secos de 15,8% com agitação do meio durante 60 minutos a cerca de 750 RPM com um agitador HEIDOLPH® a fim de que as proteínas se reidratem.

O controle da padronização é efetuado ao detector infravermelho MILKOSCAN FT 120® da sociedade FOSS®. Abaixo, um exemplo das quantidades necessárias de cada ingrediente para se obter os padrões que caracterizam o leite.

5 Tabela 1:

Ingredientes	em %
Leite desnatado	87,5
nata	8,7
Proteínas de leite desnatado 33% TP	3,8
TOTAL	100

10 O leite é então aquecido a uma temperatura de 50°C a 60°C a fim de efetivamente derreter os grumos de gorduras. Uma vez a temperatura atingida, os 10 litros são homogeneizados ao MICROFLUIDIZIER®. Isto permite quebrar os grumos graxos passando o leite por capilares através de uma grelha e sob uma pressão de 350 bar.

Um banho-maria da sociedade MEMMERT® é preparado e regulado a 103°C. O leite é transferido para 8 garrafas de 1 litro, com uma pesagem precisa desta quantidade para cada garrafa.

15 As garrafas são imersas até a parte inferior do pescoço no banho-maria a 103°C durante 35 minutos, e depois 10 minutos a 95°C no mesmo banho-maria.

As garrafas são resfriadas em um banho de água fria em fluxo contínuo, e depois armazenadas a 4°C no refrigerador de 12 a 24 horas até a utilização.

20 Inoculação dos mix lácteos:

As garrafas de leite são retiradas do refrigerador 45 minutos antes da inoculação dos fermentos e colocadas em banho-maria à temperatura de fermentação (37°C).

Quatro inoculações distintas de mix lácteos são realizadas:

- 25
- grânulos I-2494 G4I Cis-HCl,
 - grânulos testemunha I-2494 T,

- grânulos BB12 G4I Cis-HCl,
- grânulos testemunha BB12 T.

Cada inoculação é realizada no máximo 0,2 gramas de grânulos por litro de mix lácteos.

5 As garrafas são imersas no banho-maria (37°C), e a evolução do pH é acompanhada ao longo do tempo (aparelho CINAC® da sociedade YSEBAERT®).

Resultados:

10 Para *B. animalis lactis* I-2494, da mesma maneira que para *B. animalis lactis* BB12®, observa-se uma degradação do estado fisiológico do probiótico em função da presença de cisteína-HCl nos grânulos (tempo fisiológico = tempo necessário às bactérias para baixar o pH de 0,08 unidade pH; o que dá uma medida da retomada da atividade metabólica destas bactérias).

15 Estes resultados são ilustrados pela Figura 3 (I-2494 G4I, comparado ao I-2494 T).

A atividade do probiótico *B. animalis lactis* é afetado muito pela adição de cisteína- HCl nos grânulos de probiótico (aumento do Ta).

20 A cisteína-HCl não é uma fonte cisteína satisfatória para a fabricação de grânulos integrados, que compreendem *B. animalis lactis* e cisteína nos mesmos grânulos, e que são destinados à fabricação de produtos lácteos fermentados com elevado valor probiótico.

25 A solução integrada (grânulos *B. animalis lactis* + cisteína) não pode ser empregada com a cisteína-HCl, pois ela torna o fermento probiótico impróprio para uma atividade metabólica correta.

Perante estes resultados, pode ser observado que o pH de uma solução de cisteína-HCl é inferior a 3,5; mais particularmente, o pH de uma solução de cisteína-HCl a 1 g em 100 ml de H₂O é de 1,5 a 2,0, e que o probiótico *B. animalis lactis* é particularmente sensível ao pH baixo, mesmo

quando os tempos de contato forem reduzidos.

Convém, conseqüentemente, identificar uma fonte de cisteína assimilável por *B. animalis lactis*, adaptada para o consumo humano, e que apresenta em solução um pH não estressante para *B. animalis lactis*.

5 Exemplo 2: A seleção de uma L-Cisteína base permite conseguir produzir grânulos «integrados» muito eficazes, apesar dos problemas ligados à baixa solubilidade desta forma cisteína

Procede-se de maneira comparável a que foi descrito no exemplo 1 acima, mas selecionando L-cisteína base (L-cisteína; $C_3H_7NO_2S$; número CAS: 52-90-4; massa molar: 121,16), no lugar da cisteína-HCl.

A L-cisteína base é notadamente disponível junto a Ajinomoto Aminoscience LLC, Raleigh NC 27610, USA.

A solubilidade desta cisteína base é de 16 g a 100 g de H_2O a 20°C.

15 O pH de uma solução que contém 1,15 g cisteína base para 50 mL de H_2O é de 4,5 a 5,5.

Prepara-se uma solução mãe de cisteína base a 160 g/L, e mistura-se 3 gramas desta solução mãe, a 10 gramas de fermento *B. animalis lactis* (*B. animalis lactis* cepa I-2494 ou cepa BB 12®), que se formula sob forma de grânulos congelados (I-2494 G4I Cis-base; e BB12 G4I Cis-base), como descrito no exemplo 1 acima.

Grânulos testemunha I-2494 T e BB12 T são preparados utilizando 3 gramas de água, no lugar da cisteína base.

25 O esquema de fabricação destes grânulos é apresentado na figura 4.

Quatro inoculações distintas de mix lácteos são realizadas no máximo a 0,2 g/L, como descrito no exemplo 1 acima.

A quantidade de cisteína base contida nos grânulos G4I é conseqüentemente aqui de:

$(160 \times 3) / (3 + 10) = 36,92$ miligramas de cisteína base por grama de grânulos congelados G4I.

Neste ensaio, o teor de *B. animalis lactis* é de cerca de 2.10^{10} *ufc* por grama de grânulos congelados G4I ou G4 (I-2494 ou BB12).

5 Há conseqüentemente aqui aporte de 1,85 mg cisteína $C_3H_7NO_2S$ por milhões de *ufc* de fermento *B. animalis lactis*.

A quantidade cisteína base trazida nos mix lácteos pelos grânulos G4I inoculada a 0,2 g/L é de $0,2 \times 36,92 = 7,384$ mg de cisteína por litro de mix lácteos.

10 Os resultados das incubações do mix a $37^\circ C$ mostram que a seleção de cisteína base permite evitar que o estado fisiológico do fermento probiótico se degrade em uma grande medida.

Estes resultados são ilustrados pela Figura 5 (cepa I-2494).

15 O método «grânulos com cisteína integrada» (grânulos *B. animalis lactis* + cisteína) pode ser empregado com a L-cisteína base, pois *B. animalis lactis* conserva então uma atividade metabólica correta.

Exemplo 3: Desempenho do sistema integrado G4I Cis-base, por um lado em relação ao sistema combinado G4 (grânulos de cisteína distintos dos grânulos de fermento probiótico), e por outro lado em relação ao sistema testemunha
20 (grânulos T, sem cisteína).

Neste exemplo, utilizam-se grânulos de fermento *B. animalis lactis* produzidos como descritos no exemplo 2, a saber:

- grânulos BB12 T (grânulos testemunha, contendo *B. animalis lactis* BB12® + água),

25 - grânulos BB12 G4I (grânulos integrados, contendo *B. animalis lactis* BB12® + L-cisteína base, a razão de cerca de 1,85 mg de L-cisteína $C_3H_7NO_2S$ por milhões de *ufc* de fermento probiótico),

- grânulos I-2494 T (grânulos testemunha, contendo *B. animalis lactis* I-2494 + água), e

- grânulos I-2494 G4I (grânulos integrados, contendo *B. animalis lactis* I 2494 + L-cisteína base, a razão de cerca de 1,85 mg de cisteína C₃H₇NO₂S por milhões de *ufc* de fermento probiótico).

5 Neste exemplo, utilizam-se igualmente fermentos ditos técnicos, que são fermentos de *S. thermophilus* e de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*.

Os fermentos técnicos aqui utilizados correspondem a uma mistura de três cepas técnicas, a cepa I-1630 de *S. thermophilus* e às cepas I-1632 e I-1519 de *L. bulgaricus* (cepas disponíveis junto a CNCM).

10 Os fermentos técnicos são trazidos sob a forma de grânulos congelados.

Os fermentos técnicos são inóculos nos mix lácteos até cerca de 1.10^6 *ufc* de *S. thermophilus* I-1630, e de cerca de $2,7.10^5$ *ufc* de *L. bulgaricus* (com 5% da cepa I-1632 e 95% da cepa I-1519) por grama de substrato lácteo.

Seis mix lácteos são preparados como descritos no exemplo 1, e inoculados do seguinte modo:

20 - mix BB12 T e mix I-2494 T: mix testemunha, inoculados por uma mistura de grânulos de fermentos técnicos e de grânulos BB12 T ou I-2494 T, respectivamente (grânulos contendo o probiótico *B. animalis lactis* sem cisteína);

- mix BB12 G4 e mix I-2494 G4: mix do método «combinado», inoculados como os mixes testemunhas, e nos quais se acrescenta, além disso, grânulos de cisteína congelados;

25 - mix BB12 G4I e mix I-2494 G4I: mix do método «integrado», inoculados por uma mistura de grânulos de fermentos técnicos e de grânulos BB12 G4I ou I-2494 G4I, respectivamente (grânulos de *B. animalis lactis* contendo a cisteína sob forma integrada).

Os mixes são inoculados a razão de 0,5 g/L de mistura de

grânulos (0,3 g/L de fermentos técnicos, e de 0,2 g/L de grânulos de fermento probiótico *B. animalis lactis*).

Os grânulos de cisteína dos mix G4 são acrescentados, de modo a trazer 7,5 mg/l de cisteína no mix, ou seja, uma quantidade de cisteína comparável àquela trazida pelos grânulos G4I (valor calculado de 7,384 mg/l cisteína; cf. exemplo 2 acima).

Os seis mix inoculados são colocados em incubação a 37°C, como descrito no exemplo 1.

A garrafa é resfriada e armazenada a 20°C. E depois, a recoagulação da garrafa se faz a mão.

O acondicionamento se faz manualmente em potes de 125 ml e o opérculo é vedada termicamente com a termo-vedante DNV-100-25 PPV-A[®] da sociedade FESTO[®]. Os produtos são armazenados em câmara fria de 10°C por todo o período do ensaio.

Mede-se o pH durante o tempo de fermentação, assim como a evolução da biomassa (*ufc*/mL em função do número de dias) durante a conservação do produto lácteo a 10°C.

Os resultados são ilustrados pelas figuras 6 a 9.

A cepa BB12 de *B. animalis lactis* dá resultados totalmente comparáveis a esses da cepa I-2494.

Nas figuras 6 e 7 (evolução do pH em função do tempo em horas), observa-se que a presença de cisteína induz uma diferença de V_{max} , em relação ao mix testemunha. O efeito cisteína é assim visível sobre a cinética de acidificação de *B. animalis lactis*.

Observa-se igualmente que os mix G4I (L-cisteína base integrada nos grânulos de *B. animalis lactis*) dão uma cinética totalmente comparável àquela dos mix G4 (grânulos de L-cisteína base distintos dos grânulos de *B. animalis lactis*). A integração do ativador de crescimento é, conseqüentemente, perfeitamente exitosa.

Nas tabelas 2 e 3 acima, são apresentados os valores de alguns parâmetros de cinéticas de acidificação apresentados nas figuras 6 e 7.

Tabela 2 (cinéticas de acidificação BB12 da figura 6):

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

Tabela 3 (cinéticas de acidificação I-2494 da figura 7):

Fermentos técnicos com	Ta	Vmax	pHm	Tmax	pH0	TpH5,5	TpH5
I-2494T	97	-0,0060	6,13	185	6,52	309	489
I-2494 G4	95	-0,0094	5,87	218	6,53	290	418
I-2494 G4I	98	-0,0092	5,88	219	6,54	289	419

- 5 Ta tempo de latência (em min)
 Vmax velocidade máxima (em unidades pH/min)
 pHm pH a velocidade máxima de acidificação
 Tmax tempo para chegar a Vmax (em min)
 pH0 pH no início da fermentação
 10 TpH5,5 tempo para chegar ao pH 5,5 (em min)
 TpH5 tempo para chegar a pH 5 (em min)

As figuras 8 e 9, propriamente ditas, apresentam a evolução da população celular do fermento probiótico *B. animalis lactis* BB12 na figura 8, e *B. animalis lactis* probiótico I-2494 na figura 9, durante a conservação do produto lácteo fermentado (simbiose *S. thermophilus*-*L. bulgaricus*, além de *B. animalis lactis*) a uma temperatura de 10°C.

Estas curvas de população celular confirmam os resultados observados por meio das cinéticas de acidificação apresentadas nas figuras 6 e 7.

20 A presença de L-cisteína estimula muito naturalmente a população celular probiótica, e a integração de L-cisteína base é perfeitamente exitosa para cada uma das duas cepas de *B. animalis lactis* representadas.

Assim, em relação ao sistema «combinado» G4 [grânulos de fermento probiótico *B. animalis lactis* + grânulos distintos de L-cisteína

base], os grânulos «integrados» G4I de L-cisteína base são também eficazes: eles permitem conduzir uma fermentação láctica simbiótica (*S. thermophilus* + *L. bulgaricus*) que, pelo menos, também é de boa qualidade, e permitem gerar uma população celular de fermento probiótico *B. animalis lactis* que é
5 do tamanho totalmente comparável, e que também se mantém durante muito tempo ao longo da conservação do leite fermentado.

A seleção de L-cisteína base permitiu, conseqüentemente, conduzir a uma integração exitosa de ativador de crescimento específico de *B. animalis lactis*.

10 Os grânulos «integrados» G4I que contêm fermento probiótico *B. animalis lactis* e L-cisteína base, e os grânulos «combinados» G4 (grânulos de L-cisteína base distintos dos grânulos de probiótico) são bem mais eficazes do que o sistema testemunha sem cisteína (grânulos T): eles permitem conduzir a uma fermentação láctica simbiótica (*S. thermophilus* + *L.*
15 *bulgaricus*) de qualidade pelo menos comparável, gerando ao mesmo tempo uma população celular de fermento probiótico *B. animalis lactis* que é naturalmente mais elevada, e que se mantém bem mais tempo durante o tempo ao longo da conservação do leite fermentado.

REIVINDICAÇÕES

1. Inóculo que é especialmente adaptado à semeadura direta de pelo menos uma cepa de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* em um substrato lácteo, para a transformação deste substrato lácteo em produto lácteo fermentado adaptado para o consumo humano, caracterizado pelo fato de que este inóculo compreende, em mistura ou sob a forma de coleção:

- cisteína que está não ligada a outros ácidos aminados por ligação peptídica, e

- pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis*,

a referida cisteína e a referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* se encontrando cada uma contida em, ou sob forma de grânulo(s) congelado(s) e/ou liofilizado(s),

a referida cisteína sendo, além disso, a L-cisteína base, cuja fórmula sob forma reduzida é $\text{HSCH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$, de modo que o pH da solução obtida após:

- descongelamento do(s) referido(s) grânulo(s), e/ou

- ressolubilização do(s) referido(s) liofilizado(s) em uma proporção que vai de 1 a 2 grama(s) de liofilizado(s) para 8 a 10 ml de H_2O , é pelo menos igual a 4,

a referida cisteína estando presente no referido inóculo em uma quantidade que vai:

- de 1 grama a 1.10^{14} ufc da referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*),

- de 1 grama a $3,5.10^{10}$ ufc da referida, pelo menos de uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*).

2. Inóculo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a referida cisteína é L-Cisteína que apresenta um pH superior a 4

quando está em solução.

3. Inóculo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a referida cisteína não é o cloridrato de cisteína, ou o cloridrato monoidratado de cisteína.

5 4. Inóculo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que não compreende cloridrato de cisteína.

10 5. Inóculo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos um granulado congelado e/ou um liofilizado, que contém ao mesmo tempo:

- a totalidade ou parte da cisteína, e
- células da referida, pelo menos de uma, cepa de *B. animalis lactis*.

15 6. Inóculo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado pelo fato de que compreende:

- pelo menos dois grânulos congelados, ou
 - pelo menos dois liofilizados distintos, ou
 - pelo menos um granulado congelado e pelo menos um liofilizado, e em que, para cada um destes pares de entidades físicas:
- 20 - uma das duas entidades físicas contém a totalidade ou parte da cisteína, sem conter células de *B. animalis lactis*, e
- a outra das duas entidades físicas contém células de *B. animalis lactis*, sem conter cisteína.

25 7. Inóculo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a referida cisteína está presente no referido inóculo em uma quantidade que vai:

- de 0,01 miligrama por milhão de *ufc* da referida, pelo menos de uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*),

- de 30 miligramas por milhão de *ufc* da referida, pelo menos de uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*).

5 8. Inóculo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a referida cisteína está presente no referido inóculo em uma quantidade que vai:

- de 1 grama a $0,2 \cdot 10^{14}$ *ufc* da referida, pelo menos de uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*).

10 - de 1 grama a $10 \cdot 10^{10}$ *ufc* da referida, pelo menos de uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*).

15 9. Inóculo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a referida cisteína está presente no referido inóculo em uma quantidade que vai:

- de 0,05 miligrama por milhão de *ufc* da referida, pelo menos de uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*),

20 - de 10 miligramas por milhão de *ufc* da referida, pelo menos de uma, cepa de *B. animalis lactis* (ou, se existem várias, das referidas cepas de *B. animalis lactis*).

25 10. Inóculo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a referida cisteína está presente no referido inóculo em uma quantidade que vai de 4,90 mg a 144 mg para $5 \cdot 10^9$ a $5 \cdot 10^{11}$ *ufc* da referida, pelo menos de uma, cepa de *B. animalis lactis*.

11. Inóculo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que 1 grama dos referidos grânulos com 16-17% de matéria seca compreende de $5 \cdot 10^9$ a $5 \cdot 10^{11}$ *ufc* da referida, pelo menos de uma, cepa de *B. animalis lactis*.

12. Inóculo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que 1 grama dos referidos grânulos com 16-17% de matéria seca compreende de 4,90 mg a 144 mg da referida cisteína.

5 13. Inóculo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que não compreende mais de 0,5% (p/p) de levedura, extrato de levedura ou autolisado de levedura.

10 14. Inóculo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a referida cepa de *B. animalis lactis* é a cepa I-2494.

15 15. Inóculo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que compreende, além disso, pelo menos uma cepa de outra bactéria láctica além da *B. animalis lactis*.

15 16. Inóculo de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a referida, pelo menos, uma outra cepa de bactéria láctica está presente em uma estrutura física distinta desta que contém as células de *B. animalis lactis*.

20 17. Inóculo de acordo com a reivindicação 14 ou 15, caracterizado pelo fato de que a referida pelo menos uma outra cepa de bactéria láctica compreende pelo menos uma cepa de *S. thermophilus* e pelo menos uma cepa de *L. bulgaricus*.

25 18. Grânulo congelado, susceptível de ser proveniente de um inóculo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis* e da L-cisteína que está não ligada a outros ácidos aminados por ligação peptídica, a referida L-cisteína sendo uma cisteína sob forma tal que o pH da solução obtida após descongelamento do(s) referido(s) grânulo(s) seja pelo menos igual a 4.

19. Liofilizado, susceptível de ser um inóculo de acordo com

qualquer uma das reivindicações 1 a 17, ou de ser proveniente de tal inóculo, caracterizado pelo fato de que compreende pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis* e da L-cisteína que está não ligada a outros ácidos aminados por ligação peptídica, a referida L-cisteína sendo sob uma forma tal que o pH da solução obtida após ressolubilização do(s) referido(s) liofilizado(s) em uma proporção que vai de 1 a 2 grama(s) de liofilizado(s) para 8 a 10 ml de H₂O, seja pelo menos igual a 4.

20. Processo de estimulação do crescimento e/ou do metabolismo de *B. animalis lactis* sobre substrato lácteo, caracterizado pelo fato de compreender:

- a inoculação de um substrato lácteo por pelo menos um inóculo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, e/ou por pelo menos um grânulo de acordo com a reivindicação 18, e/ou por pelo menos um liofilizado de acordo com a reivindicação 19, e
- a manutenção deste substrato inóculo em condições de temperatura e de atmosfera favoráveis ao metabolismo de *B. animalis lactis*.

21. Processo de produção de um produto lácteo fermentado com elevado valor probiótico, caracterizado pelo fato de compreender:

- a inoculação de um substrato lácteo por pelo menos um inóculo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, e/ou por pelo menos um grânulo de acordo com a reivindicação 18, e/ou por pelo menos um liofilizado de acordo com a reivindicação 19, e
- a fermentação deste substrato pelo referido, pelo menos um, inóculo.

22. Processo de acordo com a reivindicação 21, caracterizado pelo fato de que compreende:

- a inoculação de um substrato lácteo por pelo menos um inóculo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, e/ou por pelo menos um grânulo de acordo com a reivindicação 18, e/ou por pelo menos um

lioofilizado de acordo com a reivindicação 19, e

- a inoculação de um substrato lácteo por pelo menos uma cepa de *S. thermophilus* e pelo menos uma cepa de *L. bulgaricus*, e

5 - a fermentação deste substrato referido, pelo menos um, inóculo e as referidas cepas de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*.

23. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 20 a 22, caracterizado pelo fato de que o referido inóculo é acrescentado no substrato lácteo em uma quantidade que traz L-cisteína e células de *B. animalis lactis* em uma quantidade que vai de 7 a 11 mg de L-cisteína por
10 litro de substrato lácteo, para 10^9 a 10^{11} ufc de células de *B. animalis lactis* por litro de substrato lácteo.

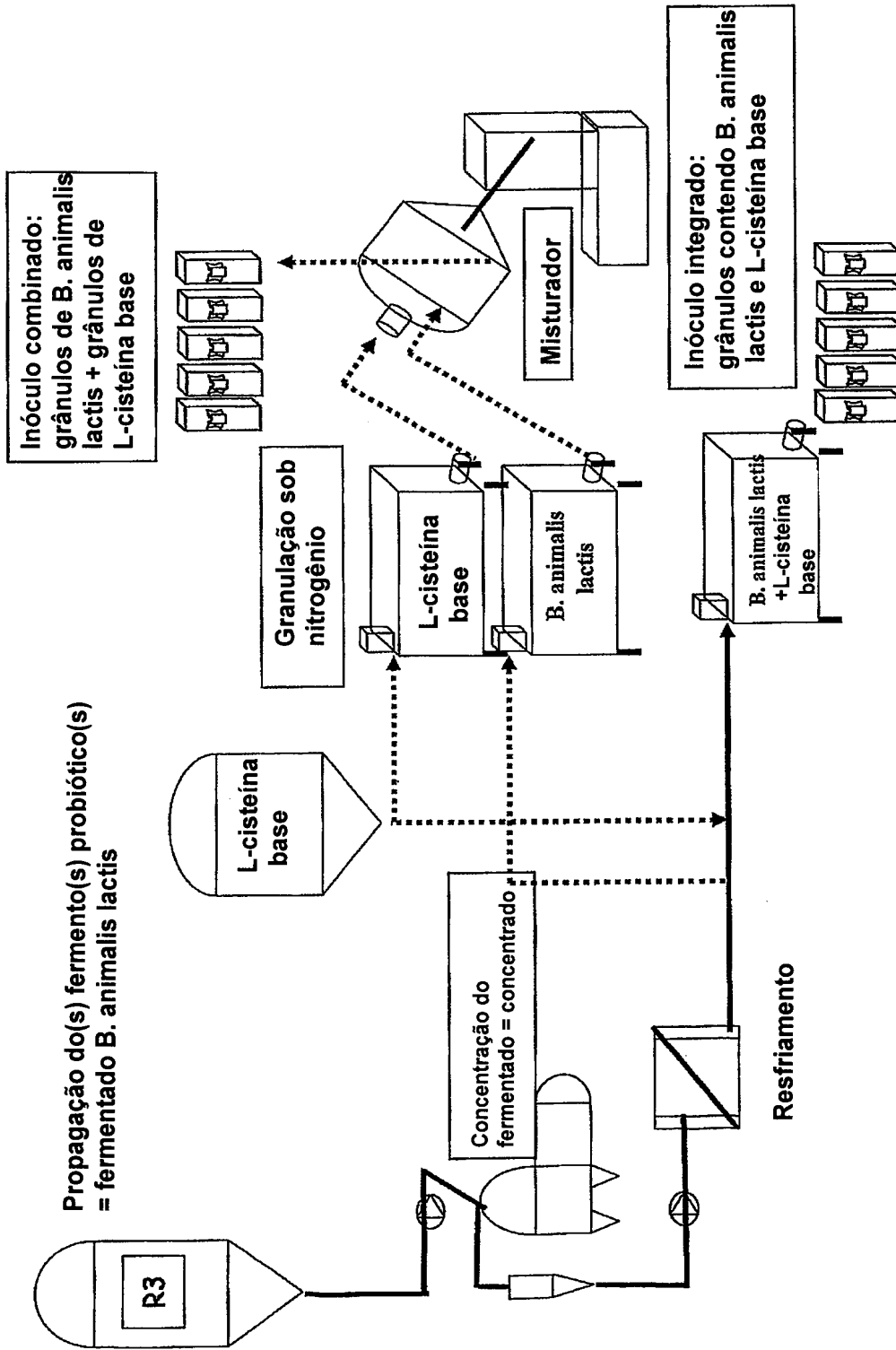


FIGURA 1

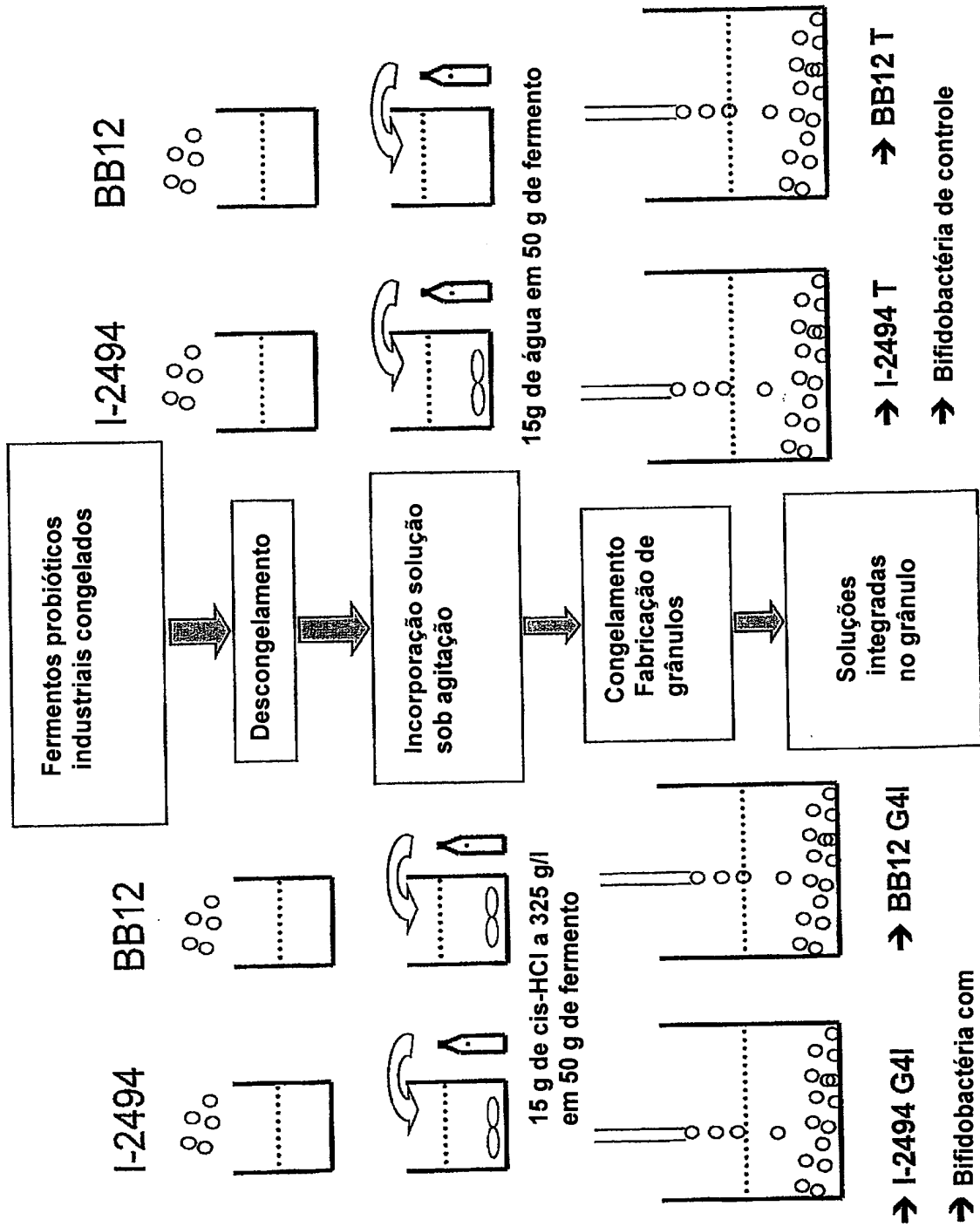


FIGURA 2

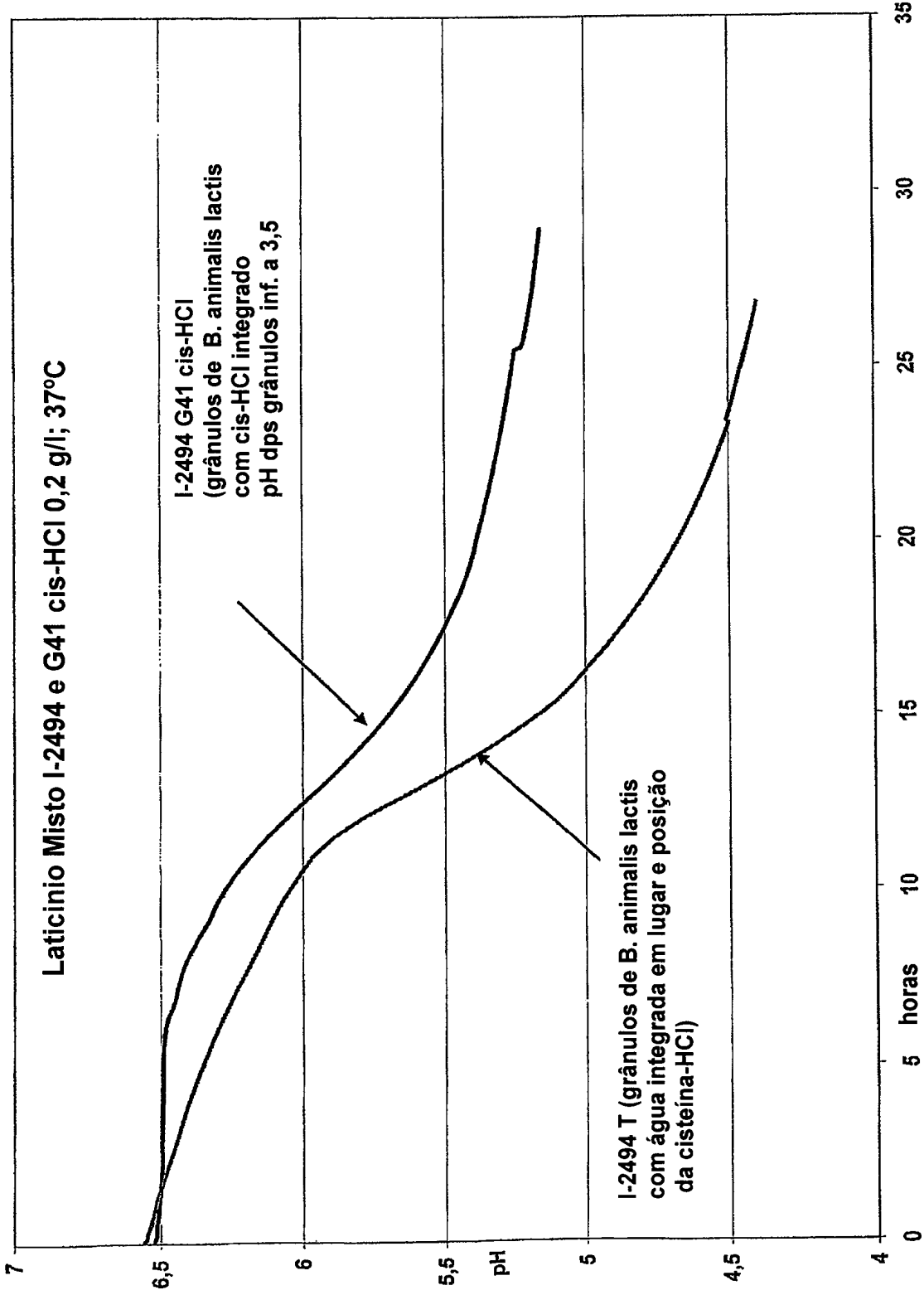


FIGURA 3

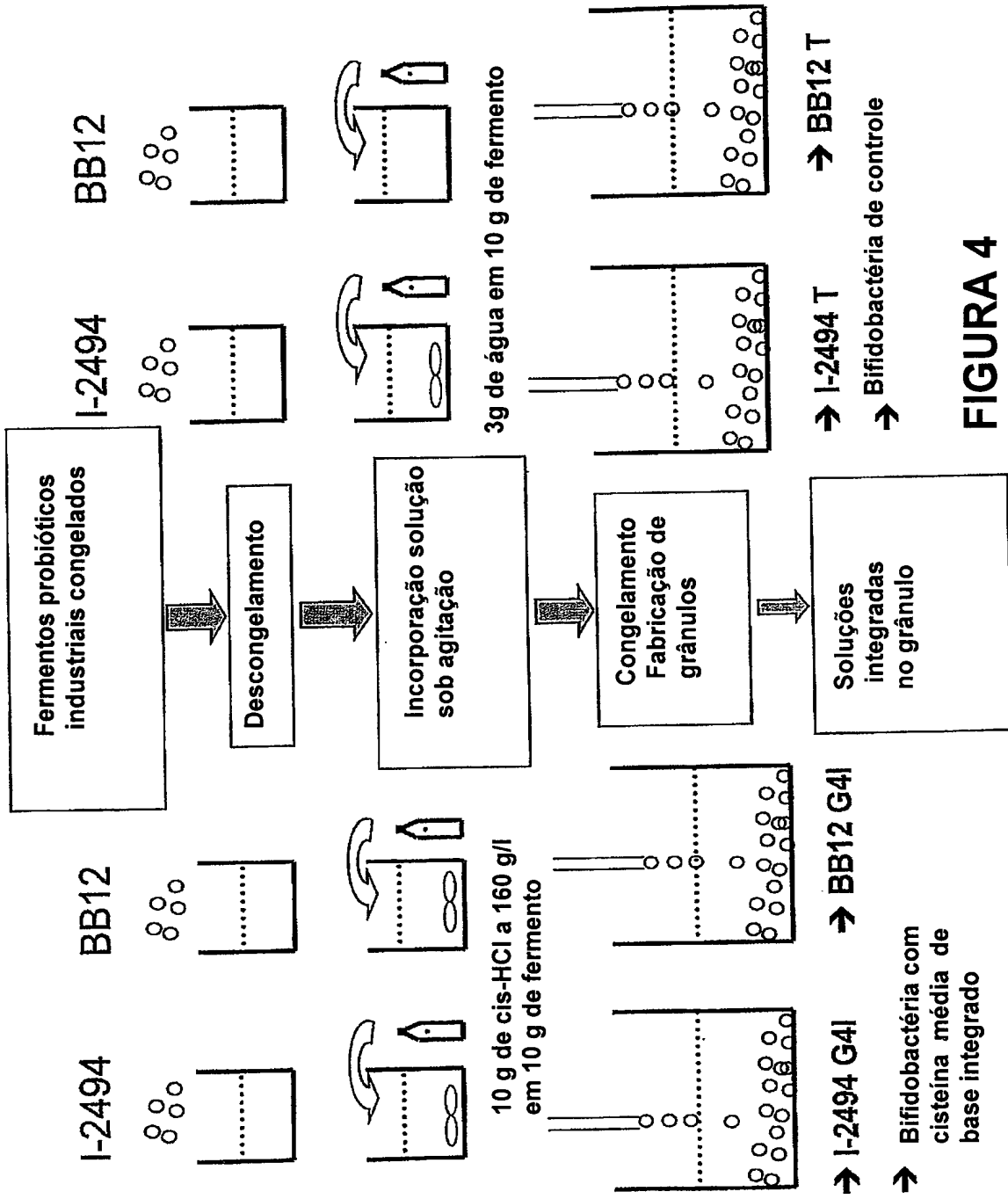


FIGURA 4

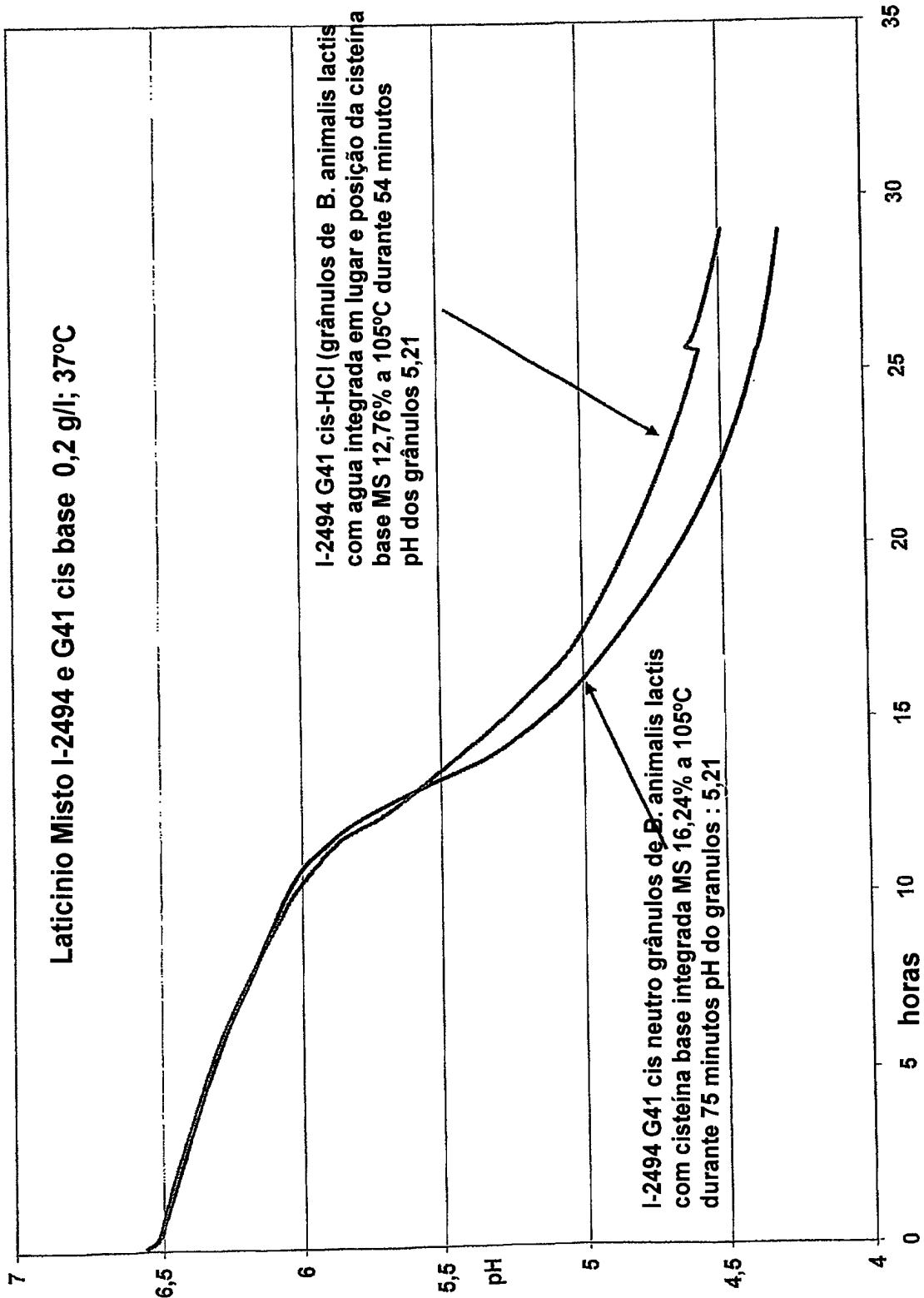


FIGURA 5

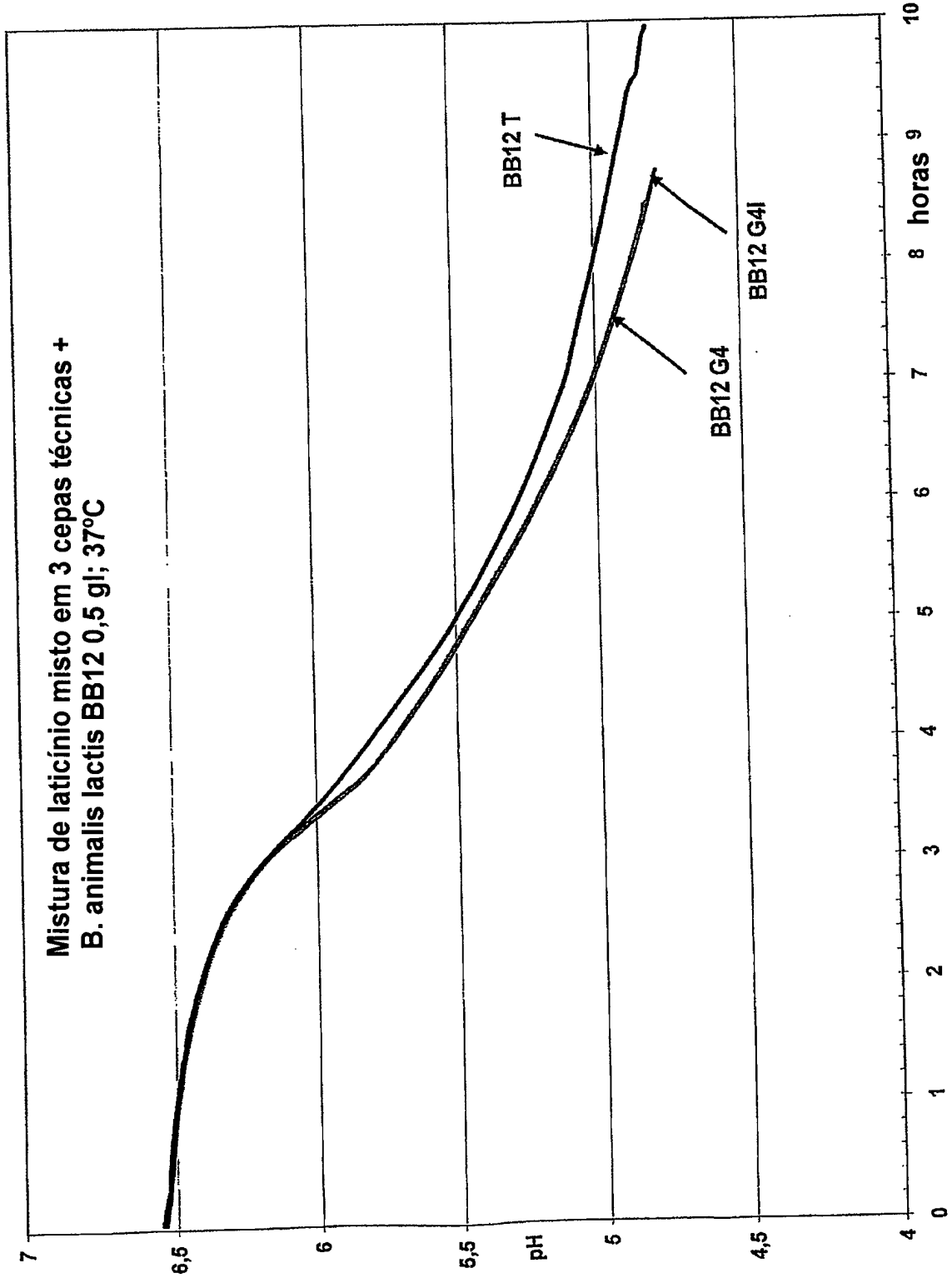


FIGURA 6

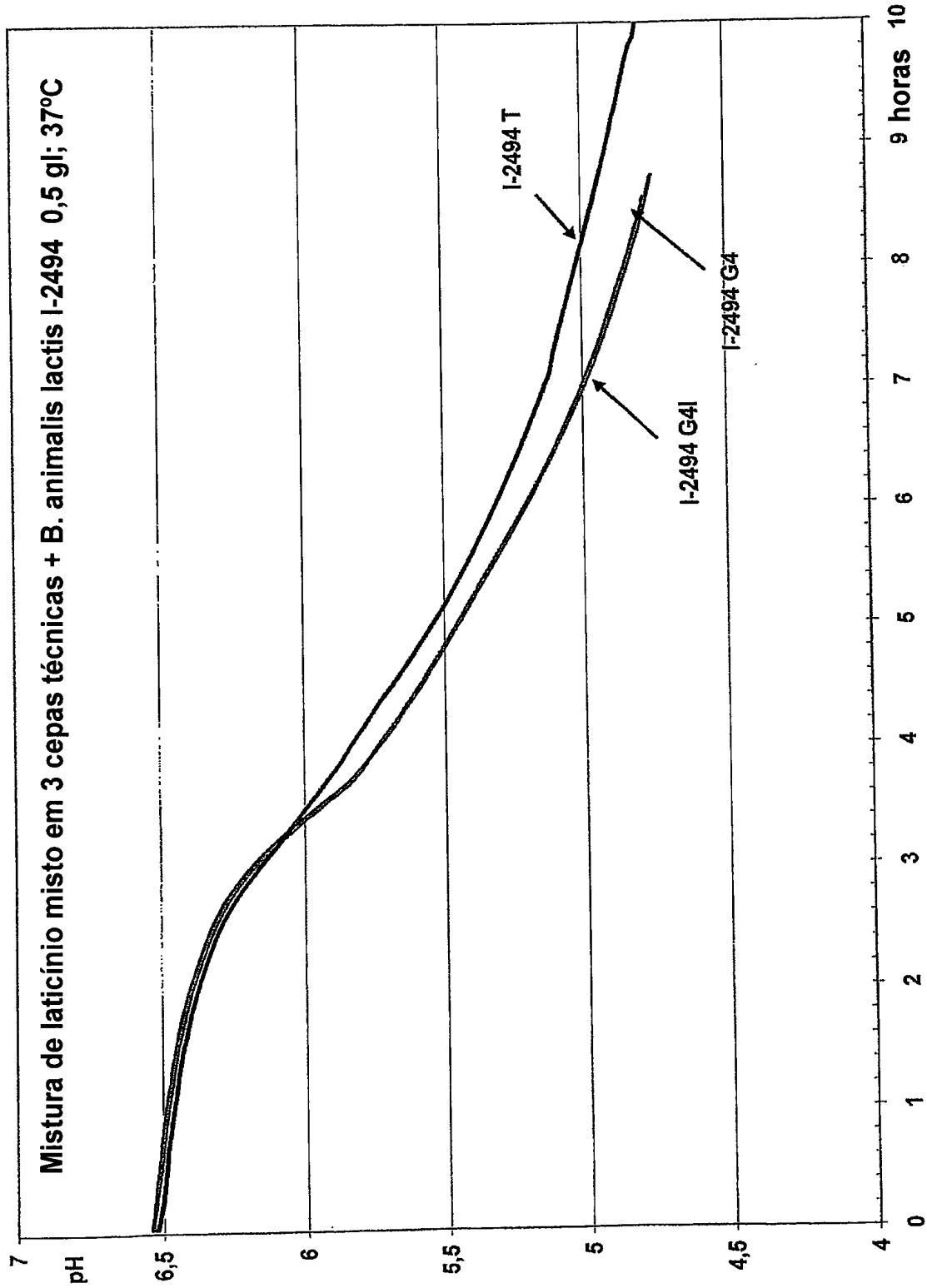


FIGURA 7

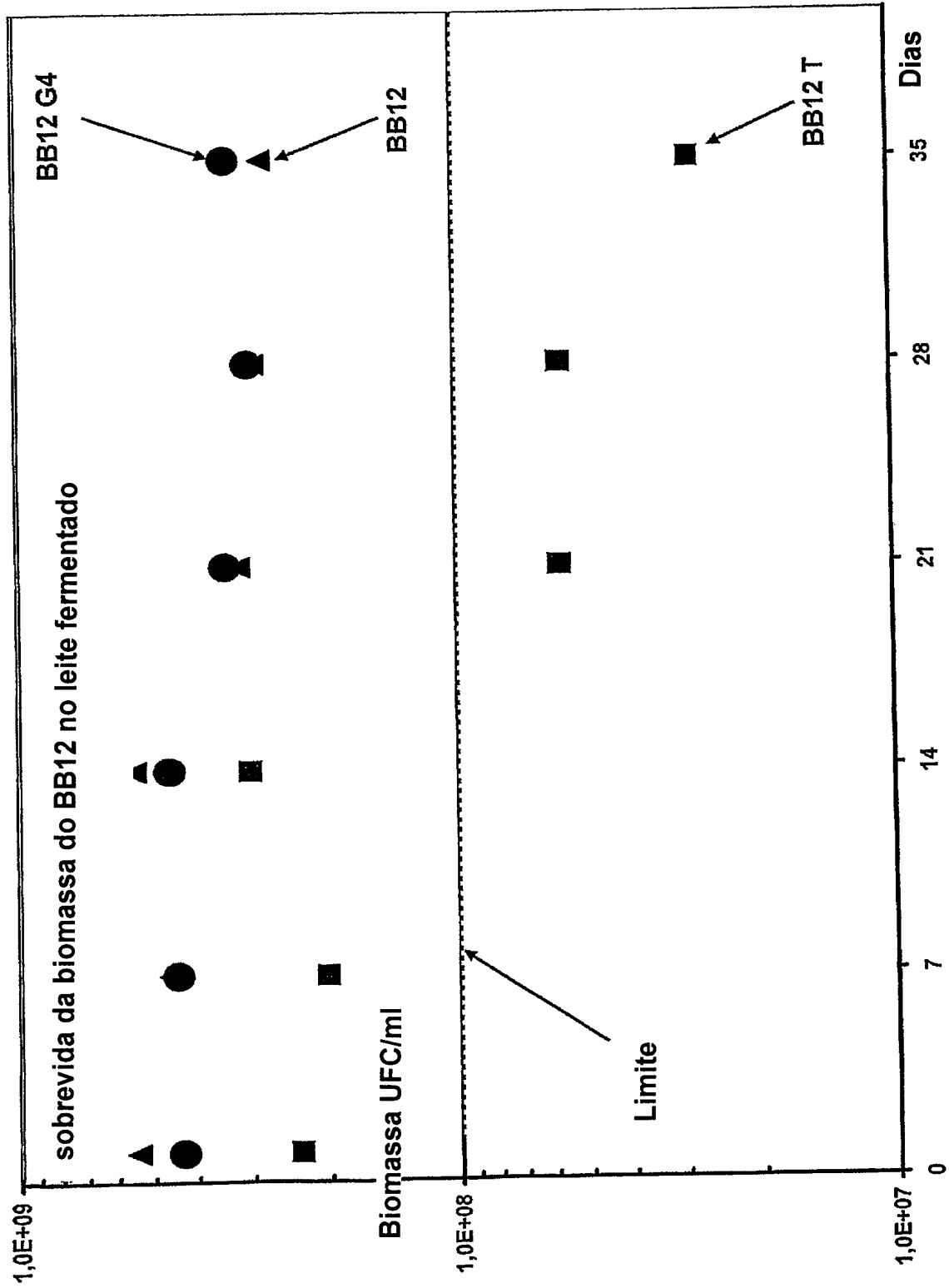


FIGURA 8

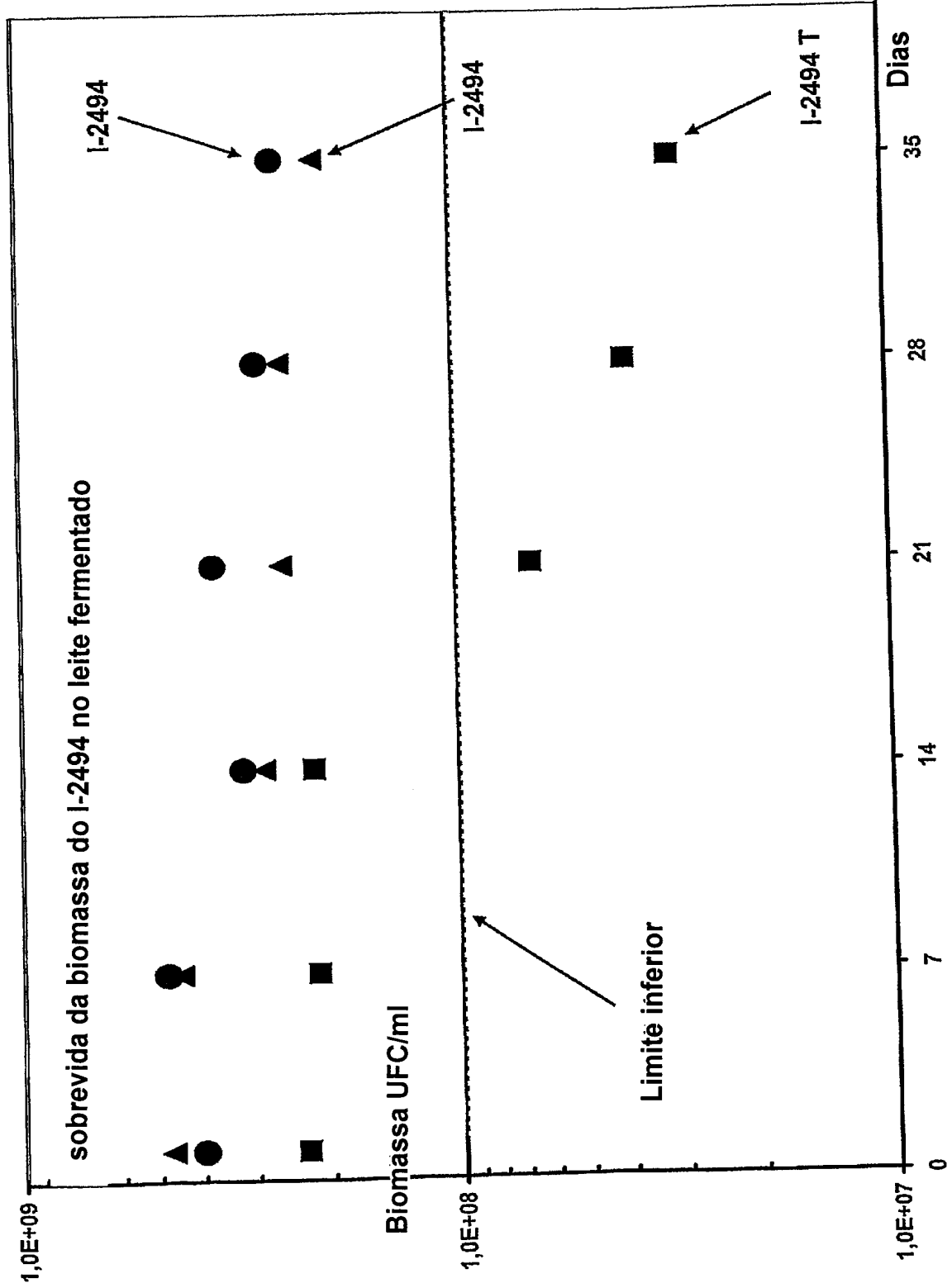


FIGURA 9

RESUMO

“INÓCULO QUE É ESPECIALMENTE ADAPTADO À SEMEADURA DIRETA DE PELO MENOS UMA CEPA DE *BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS* SSP. *LACTIS* EM UM SUBSTRATO LÁCTEO, GRÂNULO CONGELADO, LIOFILIZADO, E, PROCESSO DE ESTIMULAÇÃO DO CRESCIMENTO E/OU DO METABOLISMO DE *B. ANIMALIS LACTIS* SOBRE SUBSTRATO LÁCTEO”

O presente pedido se refere a um inóculo que é especialmente adaptado à sementeira direta de pelo menos uma cepa de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* em um substrato lácteo, para a transformação deste substrato lácteo em produto lácteo fermentado. Este inóculo compreende, em mistura ou sob a forma de coleção, L-cisteína base, e pelo menos uma cepa de *B. animalis lactis*. A referida cisteína e a referida, pelo menos uma, cepa de *B. animalis lactis* estão, cada uma, contida em, ou sob a forma de grânulo(s) em congelado(s) e/ou de liofilizado(s). Vantajosamente, a referida cisteína é integrada nos mesmos grânulos ou no mesmo liofilizado que as células de *B. animalis lactis*.