



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

(11) PI 0613530-7 B1



(22) Data do Depósito: 11/07/2006

(45) Data de Concessão: 22/12/2020

(54) Título: PRODUTOS ALIMENTÍCIOS FERMENTADOS CONTENDO CEPAS PROBIÓTICAS E SEU PROCEDIMENTO DE PREPARO

(51) Int.Cl.: A23C 9/123; A23L 33/135; A23L 33/175; A23B 7/10; A23C 11/10.

(30) Prioridade Unionista: 13/07/2005 FR 0507529.

(73) Titular(es): COMPAGNIE GERVAIS DANONE.

(72) Inventor(es): LUC TERRAGNO; FRANÇOIS DEBRU; PHILIPPE TESSIER; STÉPHANE HERVE; JEAN-MICHEL FAURIE.

(86) Pedido PCT: PCT FR2006001688 de 11/07/2006

(87) Publicação PCT: WO 2007/006970 de 18/01/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 11/01/2008

(57) Resumo: PRODUTOS ALIMENTÍCIOS FERMENTADOS CONTENDO CEPAS PROBIÓTICAS E SEU PROCEDIMENTO DE PREPARO. A invenção diz respeito principalmente à utilização de pelo menos um aminoácido sulfurado, em uma concentração total de cerca de 5 a aproximadamente 75 mg/ml, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 50 mg/ml, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 30 mg/ml, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 20 mg/ml, em forma livre, para a implementação de um procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado com o auxílio de fermentos contendo bifidobactérias, sendo que o produto alimentício fermentado apresente propriedades organolépticas aceitáveis, contendo mais de aproximadamente $5 \cdot 10^7$, em particular mais do que aproximadamente 108 bifidobactérias por grama de produto alimentício fermentado durante um período de conservação de pelo menos 30 dias, em particular de pelo menos 35 dias e não contendo mais de 0,5% de extrato de levedura ou de autolisado de levedura.

**"PRODUTOS ALIMENTÍCIOS FERMENTADOS
CONTENDO CEPAS PROBIÓTICAS E SEU PROCEDIMENTO DE
PREPARO"**

5 A invenção diz respeito a produtos alimentícios fermentados contendo cepas probióticas e seu procedimento de preparo.

As bifidobactérias fazem parte da flora anaeróbica dominante do cólon. As principais espécies presentes no cólon humano são *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum ssp infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*.

10 As bifidobactérias são bactérias probióticas de seleção. As bactérias do gênero *Bifidobacterium* são utilizadas em diversos produtos atualmente no mercado e são frequentemente acrescentadas em produtos lácteos que já incluem as bactérias clássicas do iogurte (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus bulgaricus*).

15 O consumo de bifidobactérias é reconhecido como sendo benéfico no processo de restabelecimento da população normal de bifidobactérias nas pessoas que sofreram uma terapia com antibiótico. Este consumo parece também permitir reduzir constipações, prevenir a continuidade de diarreia e diminuir os sintomas da intolerância à lactose.

20 As probióticas são bactérias vivas. A utilização destas bactérias vivas na fabricação de produtos alimentícios tais como os produtos lácteos é delicada, especialmente com relação às problemáticas de sobrevivência destas bactérias no produto.

25 80% dos produtos atualmente no mercado que contêm bifidobactérias não respeitam os critérios que permitam sustentar que eles melhoram de forma significativa o trato intestinal das pessoas que os consomem. Uma ingestão diária de pelo menos 10⁸ a 10⁹ de células vivas foi recomendada como dose mínima que permite ter um efeito terapêutico (Silva A.M., Barbosa F.H., Duarte R., Vieira L.Q., Arantes R.M., Nicole J.R., Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice, J.

30

Appl. Microbiol. 97 (2004) 29-37). A dose requerida pode depender da cepa probiótica utilizada.

No caso da fabricação de um produto alimentício bioativo que contém bifidobactérias ocorre então o problema de se obter uma
5 população suficiente destas bactérias no produto e de mantê-la ao longo da "vida" do produto, sem recorrer a soluções técnicas suscetíveis de alterar as qualidades organolépticas do produto.

O problema do tamanho numérico da população de cepas probióticas em um produto lácteo fermentado é um problema conhecido (ver
10 especialmente D. Roy, Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products, Lait 25 85 (2005) 39-56, INRA, EDP Sciences).

Diversos motivos foram evocados a este problema entre os quais a diminuição da população durante o armazenamento, o crescimento
15 conturbado destas bactérias a partir de um determinado pH ou simplesmente a má capacidade de crescimento destas bifidobactérias, em particular no leite.

Sabe-se que os fruto-oligossacarídeos, determinados amidos, determinados açúcares, o glicerol e determinados extratos de
leveduras possuem efeitos bifidogênicos importantes. Ao contrário, o oxigênio é tóxico para determinadas cepas probióticas.

Em razão disto, a utilização de cisteína ou de ascorbato na qualidade de captor de oxigênio foi descrita (A review of oxygen toxicity in
20 probiotic yogurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. Talwalkar & Kailasapathy; Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 3 (3) 117-124; 2004), sem, todavia, que tenha demonstrado que a utilização destas substâncias permita obter e manter
25 durante o armazenamento populações de bifidobactérias em níveis desejados. Além disto, o efeito potencialmente negativo da cisteína nas propriedades finais de um iogurte foi apurado.

De maneira geral, os produtos alimentícios fermentados
30 que apresentam propriedades de manutenção relativa das populações de

bifidobactérias durante a conservação dos referidos produtos, e que são descritos na literatura, não apresentam geralmente propriedades organoléticas aceitáveis, pelo fato especialmente que substâncias, tais como o extrato de levedura, estão presentes em uma concentração elevada nos produtos.

A invenção tem principalmente por objeto, fornecer produtos alimentícios fermentados que apresentam propriedades organoléticas aceitáveis e contendo uma forte concentração de bifidobactérias no término do período de fermentação e durante todo o período de conservação dos referidos produtos alimentícios fermentados.

A invenção tem também por objeto, fornecer produtos alimentícios fermentados contendo bifidobactérias em bom estado fisiológico e apresentando uma taxa de sobrevivência importante ao longo do período de conservação dos referidos produtos alimentícios fermentados, em particular até a data limite de consumo dos produtos.

Uma outra finalidade da invenção é fornecer procedimentos de preparo simples a serem implementados para permitir a obtenção dos produtos acima.

Uma outra finalidade da invenção é favorecer o crescimento das bifidobactérias com relação às simbioses clássicas apresentadas nos iogurtes, sendo estas simbioses constituídas classicamente por uma ou mais cepas de *Streptococcus thermophilus* e de *Lactobacillus bulgaricus*.

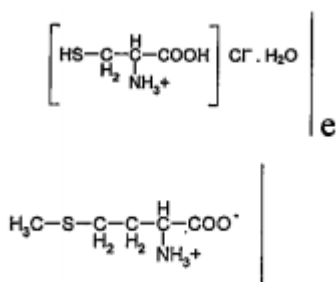
As finalidades da invenção são realizadas graças à constatação surpreendente efetuada pelos inventores de que a incorporação de aminoácidos sulfurados à matéria de partida quando do preparo de produtos alimentícios fermentados contendo bifidobactérias, em quantidade suficientemente fraca para não alterar as propriedades organoléticas dos produtos, permite obter rapidamente após fermentação das populações de pelo menos 5.10^7 , sendo 10^8 bifidobactérias por grama de produto e

uma sobrevida aumentada das bifidobactérias até a data limite de consumo dos produtos, sem obrigatoriamente modificar o crescimento das outras cepas bacterianas.

A invenção diz respeito à utilização de pelo menos um aminoácido sulfurado, em uma concentração total de cerca de 5 a aproximadamente 75 mg/L, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 50 mg/L, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 30 mg/L, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 20 mg/L em forma livre, para a implementação de um procedimento de preparo de um produto alimentício fermentado, com o auxílio de fermentos contendo bifidobactérias, sendo que o produto alimentício fermentado apresenta propriedades organolépticas aceitáveis, contendo cerca de $5 \cdot 10^7$, em particular mais de aproximadamente 10^8 bifidobactérias por 20 grama de produto alimentício fermentado durante um período de conservação de pelo menos 30 dias, em particular de pelo menos 35 dias e não tendo mais de 0,5% de extrato de levedura ou de autolisado de levedura.

Por "aminoácido sulfurado" entende-se a cisteína (L-cisteína) ou a metionina, bem como seus derivados, eventualmente em forma de sal.

Em particular, poderão ser utilizados de acordo com a invenção cloridrato monohidratado de L-cisteína (monocloridrato monohidratado de ácido (R)-2-amino- mercaptopropiônico) ou de L-metionina (ácido (S)-2-amino-4- s metiltiobutírico), com as respectivas fórmulas:



Por "em forma livre", entende-se aminoácidos que não estão ligados a outros aminoácidos por ligação peptídica nos peptídeos, polipeptídeos ou proteínas.

De preferência, os aminoácidos sulfurados conforme a invenção são utilizados em forma reduzida, ou seja, o 1º agrupamento sulfidril -SH é reduzido. Esta forma preferida dos aminoácidos sulfurados exclui então particularmente a cistina, formada da cisteína consistente na associação de duas cisteínas via uma ponte dissulfuro.

As bifidobactérias sendo substancialmente desprovidas de atividade proteolítica, é vantajoso utilizar os aminoácidos acima mencionados em forma livre para que eles possam ser diretamente assimilados pelas bifidobactérias.

O ou os aminoácidos sulfurados utilizados conforme a invenção são benéficamente filtrados previamente e/ou autoclavados (ou pasteurizados, ou seja, tratados em uma temperatura superior a 50° C) e/ou irradiados, para respeitar as especificações de uso em matéria de contaminação microbiológica, ou seja, para que eles estejam substancialmente desprovidos de contaminadores microbianos.

Se os aminoácidos sulfurados forem utilizados em uma concentração superior a 75 mg/L, verifica-se uma degradação das propriedades organolépticas do produto alimentício.

Se os aminoácidos sulfurados forem utilizados em uma concentração inferior a 5 mg/1, a população de bifidobactérias superior a 5.107 ou 108 UFC por grama de produto não poderá geralmente ser mantida quando do período de conservação do produto.

É importante observar que a concentração de aminoácidos sulfurados utilizados de acordo com a invenção se refere ao ou aos aminoácidos sulfurados especialmente acrescentados quando da preparação dos produtos. Esta concentração não leva em conta a eventual produção bacteriana de aminoácidos sulfurados quando da preparação, nem

mesmo a quantidade de aminoácidos sulfurados em forma livre que estão naturalmente presentes na matéria de partida, que serve para preparar o produto alimentício, por exemplo, no leite ou nos adjuvantes que podem intervir durante a preparação.

5 A concentração típica de aminoácidos sulfurados presentes no leite é de 100 a 1300 mg/L, sendo cerca de 260 mg/L para a cisteína e 1020 mg/L para a metionina (Handbook of Milk composition, 1995, Academic Press). Deve-se observar que a grande maioria dos aminoácidos sulfurados presentes no leite está sob forma ligada nas cadeias peptídicas ou
10 protéicas.

Por "fermentos" entendemos um conjunto de bactérias, especialmente bactérias destinadas à fermentação e/ou bactérias com valor probiótico.

Por "propriedades organolépticas aceitáveis" entendemos,
15 particularmente, a ausência de falso paladar de tipo enxofre, que foi determinada por um teste padrão de análise sensorial, a qual pode corresponder ao protocolo descrito a seguir. O mecanismo sensorial começa pela geração de um estímulo após o consumo de um produto. Este estímulo permite uma percepção que dependerá no indivíduo consumidor de fatores
20 genéticos e fisiológicos. Esta percepção é depois verbalizada (uma lista de palavras é fornecida ao consumidor) e então quantificada (utilização de gamas). O consumidor dá então uma estimativa global do produto que consumiu (esta estimativa será influenciada por sua cultura, suas experiências) e diz se está ou não pronto para comprar este produto (dados como o custo e a
25 comunicação sobre este produto podem também ser aportados).

A análise sensorial é uma ciência baseada na percepção (fisiológica e psicológica) envolvendo os cinco sentidos (paladar, olfato, visão, audição, tato) e utilizando protocolos bastante rigorosos.

Os consumidores que constituem o grupo que faz as
30 análises sensoriais são selecionados por suas capacidades sensoriais, suas

capacidades em termos de verbalização, suas capacidades em termos de utilização de gamas para uma avaliação e suas capacidades de trabalho em grupo (para obter consensos).

É absolutamente necessário verificar se as avaliações dos membros do grupo poderão ser repetidas e reproduzidas com homogeneidade em termos de discriminação e em termos de classificação. Testes que permitem verificar estes pré-requisitos são repetidos diversas vezes. A seleção dos produtos é feita de acordo com três critérios principais: de acordo com a idade do produto (escolhem-se os produtos de mesma idade). Estes produtos devem ser representativos em caso de uma avaliação padrão e os produtos são homogêneos (poucas diferenças entre eles). Estes produtos são apresentados de forma anônima e codificada, em uma determinada ordem e de maneira homogênea (mesma temperatura...).

As condições ambientais de análise sensorial são importantes: deve-se padronizar bem o ar-condicionado, a iluminação, o ambiente sonoro, a decoração (neutra se possível), o odor da peça na qual será efetuada a análise. Os membros do grupo ficam em boxes separados. Eles não devem fumar, nem consumir café, mentol nas horas precedentes à sessão de análise. Eles não devem mais se perfumar e maquiar.

Após esta análise, um produto pode ser considerado como tendo "propriedades organolépticas aceitáveis" se os membros do grupo não tiverem detectado falso paladar do tipo enxofre no produto.

O período de conservação ou de armazenamento do produto alimentício fermentado é o período imediatamente posterior ao término do processo de preparo do produto alimentício fermentado e sua embalagem. Quando deste período de conservação, o produto alimentício fermentado é habitualmente conservado a uma temperatura compreendida entre aproximadamente 4 e 10° C.

O produto alimentício fermentado acima mencionado contém cerca de 5.107, em particular mais de 108 bifidobactérias por grama de

produto alimentício fermentado, em particular durante um período de conservação de pelo menos 40 dias. Mais particularmente, o produto alimentício fermentado acima mencionado contém mais de 5.107, em particular mais de 10^8 bifidobactérias por grama de produto alimentício fermentado até a data limite de consumo do produto.

As datas limites de consumo dependem das durações legais de conservação fixadas pela legislação em vigor, que podem tipicamente variar de 15 a 50 dias, a partir da data de fabricação. A título de exemplo, a duração legal de conservação é geralmente de 30 dias para os produtos lácteos frescos.

Uma população de bifidobactérias que seja superior ou igual a 10^8 UFC/g na data limite de consumo (D.L.C.) do produto conservado entre 4 e 10° C pode ser considerada como uma população suficiente de bifidobactérias, considerando as recomendações médicas relativas ao aporte em bifidobactérias na alimentação.

Por "não contém mais de 0,5% de extrato de levedura ou de autolisado de levedura" entendemos, em particular, que o produto alimentício fermentado acima mencionado não contém mais de 0,5% de extrato de levedura ou de autolisado de levedura após seu procedimento de preparo e/ou que o produto alimentício fermentado acima mencionado não contém mais de 0,5% de extrato de levedura ou de autolisado de levedura durante a duração de conservação de pelo menos 30 dias, em particular de pelo menos 35 dias, em particular de pelo menos 40 dias ou até a data limite de consumo do produto alimentício fermentado acima mencionado. Além disto, o produto alimentício fermentado acima referido não contém mais do que uma quantidade superior a 0,5% de extrato de levedura ou de autolisado de levedura quando do procedimento de preparo do produto e, especialmente, no momento da inoculação das bactérias e durante toda a fermentação.

Por "extrato de levedura" e "autolisado de levedura", entende-se concentrados dos componentes solúveis das células de levedura. Reportamo-nos a este respeito particularmente ao artigo "Yeast extracts: production, properties 2s and components" de Rolf Sommer (9th International Symposium on Yeasts), de onde são extraídas as informações abaixo.

Os extratos de levedura são produzidos principalmente por autólise, ou seja, a hidrólise celular é efetuada sem acréscimo de outras enzimas. O extrato de levedura ou o autolisado de levedura são utilizados principalmente na indústria da fermentação e na indústria agro-alimentar. O principal material de base utilizado para fabricar o extrato de levedura é constituído de leveduras com forte concentração em proteínas (cepas de *Saccharomyces cerevisiae*) cultivadas em meios à base de molassa ou é constituído de leveduras de cerveja desidratadas (cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ou de *Saccharomyces uvarum*). Outros materiais de base utilizados são leveduras, tais como *Kluyveromyces fragiles* (fermentadas em soro lácteo) ou *Candida utilis* (cultivada em dejetos ricos em glicídios após a indústria da madeira ou em etanol) ou ainda de cepas especiais de leveduras de pão para produzir extrato de levedura contendo nucleotídeos 59.

A autólise é o procedimento de dissociação mais freqüentemente utilizado na produção de extrato de levedura. Quando deste procedimento, as leveduras são degradadas por suas próprias enzimas endógenas. O procedimento de autólise pode ser iniciado por um choque osmótico ou de temperatura controlada, provocando a morte celular sem desativar as enzimas endógenas (em particular as proteases). Um pH controlado, a temperatura e a duração da autólise são fatores decisivos de um procedimento de autólise padronizado. Acrescentando sais ou enzimas (por exemplo, proteases ou misturas de proteases e peptidases) com relação à autólise "clássica", a degradação protéica das células de leveduras pode ser controlada.

Além da autólise, o extrato de levedura pode ser produzido por termólise (por exemplo, fazendo ferver as leveduras em água a 100° C), plasmólise (tratamento com soluções fortemente salinas em uma temperatura inferior a 100°C) e degradação mecânica (homogeneização em alta pressão ou trituração).

Posteriormente, os componentes solúveis são separados das paredes celulares insolúveis e concentrados por evaporador por agitação ou evaporador rotativo. Seguem-se posteriormente as etapas eventuais de filtração, de concentração em vácuo parcial e de esterilização rápida. Existem três tipos de extrato de levedura: o extrato de levedura líquida (matéria seca: 50 a 65%); o extrato de levedura de tipo pasta viscosa (matéria seca: 70 a 80%); e o extrato de levedura em pó seco.

Se pegarmos o exemplo de um extrato de levedura em pó padrão utilizado na indústria da fermentação, a composição é a seguinte:

Conteúdo protéico: 73-75%

Sódio: menos de 0,5%

Polissacarídeos: menos de 5%

Oligossacarídeos: menos de 1%

Lipídios: menos de 0,5%

O conteúdo protéico se reparte tipicamente da seguinte forma:

Aminoácidos livres: 35-40%

Di, tri e tetrapeptídeos (MW < 600 Da): 10-15%

Oligopeptídeos (MW de 2000-3000 Da): 40-45%

Oligopeptídeos (MW de 3000-100000 Da): 2-5%

O teor típico em cisteína é de 0,45% e o teor típico em metionina é de 1,12% (1,08% em forma livre).

A invenção diz respeito à utilização de pelo menos um aminoácido sulfurado, em uma concentração total de cerca de 5 a aproximadamente 30 mg/L, em particular de cerca de 10 a aproximadamente

15 mg/L, em particular de cerca de 12 a 15 aproximadamente 15 mg/L, e particularmente 12,5 mg/L, em forma livre, para a implementação de um procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado com o auxílio de fermentos contendo bifidobactérias, produto alimentício este que apresenta propriedades organoléticas aceitáveis e contém mais de aproximadamente 5.107, em particular mais de aproximadamente 10^8 bifidobactérias por grama de produto alimentício fermentado durante um período de conservação de pelo menos 30 dias, em particular de pelo menos 35 dias e não contém mais de 0,5% de extrato de levedura ou de autolisado de levedura.

Além disto, a invenção diz respeito, igualmente, a um produto alimentício fermentado, apresentando propriedades organoléticas aceitáveis, contendo fermentos que possuem mais de aproximadamente 5.107, em particular mais de aproximadamente 10^8 bifidobactérias por grama de produto alimentício fermentado durante um período de conservação de pelo menos 30 dias, em particular de pelo menos 35 dias e apresentando uma concentração total de aminoácidos sulfurados em forma livre de cerca de 5 a aproximadamente 50 mg/L, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 30 mg/L, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 20 mg/L, em particular de cerca de 10 a aproximadamente 15 mg/L, em particular de cerca de 12 aproximadamente 15 mg/L, e particularmente 12,5 mg/L.

Mais particularmente, o referido produto alimentício fermentado contém fermentos que possuem mais de aproximadamente 5.107, em particular mais de aproximadamente 10^8 bifidobactérias por grama de produto alimentício fermentado durante um período de conservação de pelo menos 40 dias ou até a data limite de consumo do produto alimentício fermentado.

Vantajosamente, o produto alimentício fermentado como definido acima é tal que a relação entre o número de bifidobactérias contidas no produto alimentício fermentado após o período de conservação e o

número de bifidobactérias contidas no produto alimentício fermentado no início do período de conservação de pelo menos 30 dias, em particular de pelo menos 35 dias, é de cerca de 0,2 a 2s aproximadamente 0,8, em particular de cerca de 0,3 a aproximadamente 0,7, em particular de cerca de 0,4 a aproximadamente 0,5.

Em outras palavras, a taxa de sobrevivência das bifidobactérias contidas no produto alimentício fermentado entre o início do período de conservação (ou seja, o término do procedimento de preparo) e o término do período de conservação está compreendido entre 20 e 80%, em particular entre 30 e 70% e, em particular, entre 40 e 50%.

O referido período de conservação é de pelo menos 30 dias, em particular de pelo menos 35 dias, mais particularmente de pelo menos 40 dias ou se estende até a data limite de consumo do produto alimentício fermentado.

A invenção diz respeito igualmente a um produto alimentício fermentado conservado durante um período de conservação de pelo menos 30 dias, em particular de pelo menos 35 dias, a uma temperatura de cerca de 4 a aproximadamente 10° C, apresentando propriedades organoléticas aceitáveis e contendo fermentos comportando mais de aproximadamente 5.107, em particular mais de aproximadamente 10⁸ bifidobactérias por grama de produto alimentício fermentado.

Mais particularmente, a invenção diz respeito a um produto alimentício fermentado não sólido conservado durante um período de conservação de pelo menos 30 dias, em particular de pelo menos 35 dias, em particular de pelo menos 40 dias, a uma temperatura inferior a 12° C ou inferior a 10° C, apresentando propriedades organoléticas aceitáveis e contendo fermentos com mais de aproximadamente 5.107, em particular mais de aproximadamente 10⁸ bifidobactérias por grama de produto alimentício fermentado.

Preferencialmente, a invenção diz respeito a um produto alimentício fermentado tal como definido acima, contendo cerca de 5 a aproximadamente 50 mg/L, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 30 mg/L, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 20 mg/L, em particular de cerca de 10 a aproximadamente 15 mg/L, em particular de cerca de 12 a aproximadamente 15 mg/L, e particularmente 12,5 mg/L de aminoácidos sulfurados e particularmente de cerca de 5 a aproximadamente 50 mg/L, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 30 mg/L, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 20 mg/L, em particular de cerca de 10 a 15 aproximadamente 15 mg/L, em particular de cerca de 12 aproximadamente 15 mg/L, e particularmente 12,5 mg/L de cisteína e/ou de cerca de 5 a aproximadamente 30 mg/L, em particular cerca de 5 a aproximadamente 15 mg/L de metionina.

Para dosar a cisteína, é possível utilizar um analisador de aminoácidos como o L-8800 High Speed Amino Acid Analyzer (Hitachi High Technologies). Este analisador associa uma cromatografia de troca de íons a uma detecção colorimétrica em duas extensões de onda (570 e 440 m) após reação com ninidrina. Pode-se igualmente recorrer à cromatografia em fase gasosa ligada a uma espectrometria de massa ou uma cromatografia líquida alta performance ligada a uma detecção fluorimétrica.

A utilização mais particular de cisteína é benéfica porque ela proporciona experimentalmente um melhor efeito bifidogênico do que a metionina.

A utilização mais particular de metionina é benéfica porque seu custo é menos elevado do que aquele da utilização da cisteína.

Vantajosamente, o referido produto alimentício fermentado contém menos de aproximadamente 0,5% (p/p) de substâncias contendo mais de aproximadamente 1,7% de aminoácidos sulfurados livres.

Mais particularmente, o referido produto alimentício fermentado contém menos de aproximadamente 0,5% (p/p) de extrato de

levedura e/ou de autolisado de levedura e/ou de hidrolisado de proteínas do leite, de vegetais, de soja.

A presença eventual de substâncias do tipo extrato de levedura ou autolisado de levedura é facilmente detectável no produto por métodos conhecidos. Em particular, os glucanos ou os mananos aportados por estas substâncias são detectáveis. Por exemplo, os glucanos e mananos sendo fibras, podemos recorrer ao método da dosagem das fibras alimentares totais, preconizado pela AFSSA (método AOAC 985.29). O acréscimo de extrato de levedura ou de uma substância análoga deve igualmente se traduzir por uma modificação completa do teor na totalidade dos 20 aminoácidos no produto, bem como por uma modificação da concentração em vitaminas e minerais, com relação à composição normal do produto (para o exemplo do leite, referimo-nos particularmente ao Handbook of milk composition, 1995, Academic Press).

De acordo com um modo de realização preferencial, as bifidobactérias contidas no produto alimentício fermentado tal como definido acima são do tipo *Bifidobacterium animalis*, especialmente *Bifidobacterium animalis animalis* e/ou *Bifidobacterium animalis lactis* e/ou *Bifidobacterium breve* e/ou *Bifidobacterium longum* e/ou *Bifidobacterium infantis* e/ou *Bifidobacterium bifidum*.

Vantajosamente, o produto alimentício fermentado tal como definido acima é à base de sumo vegetal e particularmente de sumo de fruta ou de sumo de legume, tal como de suco de soja, ou de produto lácteo, e, particularmente, de leite de vaca e/ou de leite de cabra.

O referido produto alimentício fermentado pode igualmente ser à base de leite de ovelha ou de leite de camelo ou de leite de égua.

Por sumo vegetal entende-se um sumo realizado a partir de extratos vegetais, particularmente de soja, de tonyu, de aveia, de trigo, de milho.

Exemplos de sumos de legume são: o sumo de tomate, o sumo de beterraba, o sumo de cenoura.

Exemplos de sumos de fruta são: o sumo de maçã, de laranja, de morango, de pêsego, de abricó, de ameixa, de framboesa, de amora, de groselha, de abacaxi, de limão, de agrumes, de manga, de banana, de kiwi, de pêra, de cereja, de maracujá, de fruta exótica, o sumo multifrutas.

De acordo com o modo de realização benéfico, o produto alimentício fermentado tal como definido acima é tal que os fermentos contêm bactérias lácticas, em particular um ou mais bactérias do gênero *Lactobacillus* spp. e especialmente *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* e/ou *Lactobacillus casei* e/ou *Lactobacillus reuteri* e/ou *Lactobacillus acidophilus* e/ou *Lactobacillus helveticus* e/ou *Lactobacillus plantarum* e/ou bactérias do tipo *Lactococcus cremoris* e/ou *Streptococcus thermophilus* e/ou *Lactococcus lactis* e/ou uma ou mais bactérias do gênero *Leuconostoc*.

Vantajosamente, o produto alimentício fermentado tal como definido acima é tal que a proporção de bifidobactérias nos fermentos é de cerca de 20 a aproximadamente 80%, particularmente de cerca de 30 a aproximadamente 70%, particularmente de cerca de 40 a aproximadamente 60%, e particularmente de cerca de 50%.

Por "proporção de bifidobactérias nos fermentos", entende-se a proporção das bifidobactérias com relação ao número total de bactérias incluídas no produto alimentício fermentado, ou seja, com relação à totalidade das bifidobactérias e das outras bactérias, particularmente as bactérias *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*.

O bom equilíbrio numérico entre as bifidobactérias e as outras cepas bacterianas no produto alimentício fermentado após o procedimento de preparo e a manutenção substancial deste equilíbrio durante o período de conservação são os fatores que essencialmente garantem a qualidade do produto alimentício.

Uma proporção de 50% de bifidobactérias constitui um bom compromisso entre as problemáticas de custo (as bifidobactérias costumam caro) e as problemáticas de obtenção de uma população correta de bifidobactérias.

5 De acordo com um modo de realização preferido, o produto alimentício fermentado tal como definido acima se apresenta sob a forma de um produto alimentício fermentado batido ou de um produto alimentício fermentado para beber ou de um produto alimentício fermentado sólido ou de um produto alimentício fermentado infantil.

10 Por "produto [...] batido" entende-se um produto, particularmente um leite, germinado, fermentado, misturado mecanicamente depois acondicionado. A fermentação de tal produto não é efetuada em frasco mais em mistura, em cubas. O leite coalhado é batido depois resfriado antes de ser acondicionado em potes, que são armazenados no frio. Por coalhada
15 entende-se uma massa sólida de proteínas especialmente de leite.

Por "produto [...] para beber" entende-se um produto em forma substancialmente líquida. Um produto para beber é um produto tal que, após a etapa de mistura mecânica, o produto é batido nas cubas antes de ser embalado.

20 Por "produto [...] sólido" entende-se um produto (particularmente um leite) germinado e diretamente acondicionado em potes onde ele fermenta. Após levedura, o produto é acondicionado em potes. Estes potes passam em seguida, geralmente, à estufa durante 3 horas. As bactérias se reproduzem e consomem a lactose que é então transformada parcialmente
25 em ácido láctico, o que modifica a estrutura das proteínas, formando o que chamamos de "gel láctico". Os potes passam em seguida à câmara de frio ventilada ou ao tubo de resfriamento e são armazenados a 2-4° C.

Por "produto [...] infantil" entende-se um produto adaptado às necessidades de alimentação, com fraco teor de proteínas e gordura.

O referido produto alimentício fermentado pode ser particularmente um iogurte ou iogurte sólido, batido ou para beber ou uma barra contendo a matéria láctea, kefir, um biscoito com camada láctea, uma água contendo probióticos.

5 Além disto, a invenção se refere igualmente a um procedimento de preparo de um produto alimentício fermentado a partir de uma matéria de partida, compreendendo:

- uma etapa de germinação de uma matéria de partida, eventualmente pasteurizada, por inoculação de fermentos de germinação
10 contendo bifidobactérias para obter uma matéria germinada,

- uma etapa de fermentação da matéria germinada obtida na etapa precedente, de forma a obter uma matéria fermentada,

- uma etapa de incorporação de pelo menos um aminoácido sulfurado em forma livre em concentração de cerca de 5 a
15 aproximadamente 75 mg/L, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 50 mg/L, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 30 mg/L, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 20 mg/L, em particular de cerca de 10 a aproximadamente 15 mg/L, em particular de cerca de 12 a aproximadamente 15 mg/L, e particularmente 12,5 mg/L, esta etapa de incorporação podendo
20 ocorrer

- seja antes da etapa de germinação,

- seja de forma substancial, simultaneamente à etapa de germinação,

- seja após a etapa de germinação e antes da etapa de
25 fermentação, desde que o produto alimentício fermentado não contenha mais de 0,5% (p/p) de extrato de levedura e/ou de autolisado de levedura.

Por "fermentação" entende-se uma reação bioquímica que consiste em liberar energia a partir de um substrato orgânico, sob a ação de microorganismos. Trata-se de um procedimento de transformação de uma
30 matéria-prima pelos microorganismos, transformação esta então que produz

biomassa e metabólitos. Em particular, a fermentação láctica é um processo anaeróbico de consumo da lactose pelas bactérias dos fermentos, o que provoca a formação do ácido láctico e uma diminuição do pH.

A invenção se origina da constatação surpreendente
5 efetuada pelos inventores que a regulação de aminoácidos sulfurados nas gamas acima citadas, na ausência de extrato de levedura e/ou de autolisado de levedura ou na presença de uma concentração fraca destes, permite melhorar a resistência das bifidobactérias e sua capacidade de sobreviver. As bifidobactérias contidas no produto alimentício fermentado após o10 procedimento de preparo da invenção ficam em um melhor estado fisiológico que se a etapa de incorporação de aminoácidos sulfurados fosse omitida, o que permite a um maior número destas bifidobactérias sobreviver durante a conservação do produto alimentício fermentado que segue.

A cisteína e/ou a metionina têm então um efeito
15 bifidogênico específico. Em compensação, a utilização do extrato de levedura e/ou de autolisado de levedura, particularmente em concentrações superiores a 0,5% (p/p), tende a estimular o conjunto das bactérias contidas no produto alimentício fermentado, o que permite levar a um desequilíbrio da simbiose bacteriana em desfavor das bifidobactérias, e em favor particularmente, se elas
20 estiverem presentes, das bactérias lácticas. As consequências deste desequilíbrio são modificação do pH, uma produção de ácido acético e/ou de H₂O₂, todas elas prejudiciais à qualidade do produto.

Além disto, deve-se observar que a partir de uma
concentração em aminoácidos sulfurados superior a 30 mg/L, em particular a
25 partir de uma concentração em aminoácidos sulfurados superior a 50 mg/L, e mais particularmente a partir de uma concentração em aminoácidos sulfurados superiores a 75 mg/L, é verificada uma clara degradação das propriedades organolépticas dos produtos alimentícios. Esta degradação é constatada através de um teste de paladar padrão tal como descrito acima, que revela a existência
30 de um paladar sulfurado suscetível de tornar os produtos impróprios para

consumo e para comercialização. É importante observar que o paladar sulfurado desagradável ocorre especialmente em caso de incorporação de cisteína e/ou de metionina em mais de 75 mg/L, até mesmo em determinados casos em mais de 50 ou 30 mg/L, mas também quando as concentrações em aminoácidos sulfurados ultrapassam tais valores em razão da presença de substâncias suplementares, por exemplo, extrato de levedura ou de autolisado de levedura, especialmente em proporção superior a 0,5% (p/p).

Uma outra característica importante do procedimento da invenção é que a incorporação dos fermentos contendo bifidobactérias é feita diretamente na matéria de partida destinada a tornar o produto alimentício fermentado, sem ter necessariamente recorrido a meios artificiais/sintéticos de crescimento intermediários.

De acordo com um modo de realização particular, o procedimento tal como definido acima não inclui etapa de acréscimo de substâncias suplementares contendo um ou mais aminoácidos sulfurados.

De acordo com um modo de realização particular, o procedimento tal como definido acima não inclui etapa de acréscimo de substâncias suplementares contendo um ou mais aminoácidos sulfurados em forma livre, sendo a concentração de aminoácidos sulfurados em forma livre nas substâncias suplementares inferior a aproximadamente 1,7%, de preferência inferior a cerca de 0,5% e a concentração das referidas substâncias suplementares no produto alimentício fermentado sendo inferior a aproximadamente 0,5%.

Mais particularmente, a referida etapa de acréscimo de substâncias suplementares pode consistir em um acréscimo de um extrato de levedura e/ou de um autolisado de levedura e/ou de um hidrolisado de proteínas de leite, de vegetais, de soja, em uma concentração inferior a aproximadamente 0,5% (p/p).

De maneira preferencial, esta etapa de acréscimo de substâncias suplementares ocorre antes da etapa de fermentação, por

exemplo, de forma substancial, simultaneamente à etapa de germinação e/ou simultaneamente à etapa de incorporação de pelo menos um aminoácido sulfurado.

O interesse de um acréscimo, de forma substancial, simultaneamente à etapa de germinação e/ou simultaneamente à etapa de incorporação de pelo menos um aminoácido sulfurado é de ordem prática. Neste caso, as substâncias suplementares do tipo extrato de levedura são pelo menos parcialmente degradadas durante a fermentação, porque elas servem de aporte nutricional para os fermentos. Assim, a concentração das substâncias suplementares do tipo extrato de levedura varia durante a fermentação.

Vantajosamente, o procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado tal como definido acima inclui igualmente uma etapa de pasteurização que ocorre antes da etapa de germinação, permitindo obter uma matéria de partida pasteurizada a partir da matéria de partida.

Por "pasteurização" entende-se o método usual no campo da conservação dos alimentos que consiste em um aquecimento rápido sem ferver, acompanhado de um resfriamento brusco, o que permite a destruição da maioria das bactérias, conservando parcialmente as proteínas.

Conforme um modo de realização particular, a etapa de incorporação de pelo menos um aminoácido sulfurado ocorre antes da etapa de pasteurização, sendo o ou os aminoácidos sulfurados incorporados em uma concentração de cerca de 5 a aproximadamente 75 mg/L, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 30 mg/L, em particular de cerca de 10 a aproximadamente 15 mg/L, em particular de cerca de 12 a 25 aproximadamente 15 mg/L, e particularmente 12,5 mg/L.

O interesse de uma incorporação antes da etapa de pasteurização é de ordem prática.

De acordo com outro modo de realização particular, a etapa de incorporação de pelo menos um aminoácido sulfurado ocorre, de

forma substancial, simultaneamente à etapa de germinação, sendo o ou os aminoácidos sulfurados incorporados em uma concentração de cerca de 5 a aproximadamente 75 mg/L, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 30 mg/L, em particular de cerca de 10 a aproximadamente 15 mg/L, em particular de cerca de 12 a aproximadamente 15 mg/L, e particularmente 12,5 mg/L.

O interesse de uma incorporação, de forma substancial, simultaneamente à etapa de germinação é de ordem econômica (o ou os aminoácidos sulfurados não são parcialmente destruídos por um eventual tratamento térmico ou pasteurização antes da germinação) e de ordem prática.

De acordo com outro modo de realização particular, a etapa de incorporação de pelo menos um aminoácido sulfurado ocorre após da etapa de germinação e antes da etapa de fermentação, sendo o ou os aminoácidos sulfurados incorporados em uma concentração de cerca de 5 a aproximadamente 50 mg/L, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 30 mg/L, em particular de cerca de 5 a aproximadamente 20 mg/L, em particular de cerca de 10 a aproximadamente 15 mg/L, em particular de cerca de 12 a aproximadamente 15 mg/L e particularmente 12,5 mg/L.

O interesse de uma incorporação após a etapa de germinação e antes da etapa de fermentação é de ordem prática e garante uma sobrevida aumentada das bifidobactérias durante o armazenamento do produto.

Deve-se observar que no caso em que a incorporação do ou dos aminoácidos sulfurados ocorra antes da etapa de pasteurização, a quantidade de aminoácidos sulfurados a incorporar deve ser majorada em cerca de 30 a 50% com relação ao caso em que esta incorporação ocorra após a eventual etapa de pasteurização, ou seja, de forma substancial, simultaneamente à etapa de germinação ou após a etapa de germinação. Na verdade, no primeiro caso, uma parte dos aminoácidos sulfurados é destruída quando da pasteurização.

Em outras palavras, a parte superior da gama de concentração de aminoácidos sulfurados de 50-75 mg/L, que está incluída na gama de concentração de aminoácidos sulfurados prevista na invenção se refere mais especificamente ao caso ou à incorporação dos aminoácidos sulfurados anteriormente a uma etapa de pasteurização.

Deve-se observar que é desejável dividir a etapa de incorporação de aminoácidos sulfurados em duas sub-etapas ou mais, que podem eventualmente ocorrer em momentos diferentes no procedimento conforme a invenção. A concentração de aminoácidos sulfurados que é indicada acima corresponde então à concentração total de aminoácidos sulfurados após diferentes sub-etapas de incorporação de aminoácidos sulfurados.

De acordo com um modo de realização preferencial, o procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado tal como definido acima compreende uma etapa de acréscimo de uma preparação intermediária simultaneamente à etapa de germinação ou entre a etapa de germinação e a etapa de fermentação, de forma a obter, a partir da matéria germinada, uma matéria germinada completada, ou após a etapa de fermentação, de forma a obter, a partir da matéria fermentada, uma matéria fermentada completada, a referida preparação intermediária contendo uma preparação de frutas e/ou de cereais e/ou de aditivos tais como aromas e corantes, podendo a referida etapa de acréscimo de uma preparação intermediária ocorrer simultaneamente à etapa de incorporação de pelo menos um aminoácido sulfurado.

A preparação intermediária pode particularmente ser engrossada (fibras solúveis e insolúveis, alginatos, carragenanos, goma xantana, pectina, amido, particularmente em forma de gelatina, goma gelana, celulose e seus derivados, goma de guar e de carouba, inulina) ou edulcorantes (aspartame, acesulfame K, sacarina, sacarose, ciclamato) ou conservantes.

Exemplos de aromas são: o aroma de maçã, laranja, morango, kiwi, coco.

Exemplos de corantes são: o beta caroteno, o carmim, o vermelho de cochonilha.

5 Além disto, o preparo de frutas acima referido pode conter frutas inteiras ou em pedaços ou em geléia ou em compota, permitindo, por exemplo, obter iogurtes com frutas.

A preparação intermediária pode ainda conter extratos vegetais (soja, arroz...).

10 De acordo com outro modo de realização da invenção, a etapa de germinação compreende a inoculação de fermentos de germinação contendo cerca de 10^6 a aproximadamente 2.10^8 , mais particularmente cerca de 10^6 a aproximadamente 10^7 bifidobactérias por mL (ou por grama) de matéria de partida.

15 Se inoculamos uma quantidade de bifidobactérias superior a esta gama, falsos paladares do tipo ácido acético são suscetíveis de se desenvolverem. Se inoculamos uma quantidade de bifidobactérias inferior a esta gama, a quantidade final de bifidobactérias será insuficiente.

Vantajosamente, no procedimento de preparação de um
20 produto alimentício fermentado conforme a invenção, as bifidobactérias são selecionadas dentre as bactérias do tipo *Bifidobacterium animalis*, particularmente *Bifidobacterium animalis animalis* e/ou *Bifidobacterium animalis lactis* e/ou *Bifidobacterium breve* e/ou *Bifidobacterium longum* e/ou *Bifidobacterium infantis* e/ou *Bifidobacterium bifidum*.

25 De maneira particularmente preferencial, no procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado conforme a invenção, as bifidobactérias são selecionadas dentre as bactérias do tipo *Bifidobacterium animalis*.

Vantajosamente, no procedimento de preparação de um
30 produto alimentício fermentado conforme a invenção, os fermentos de

germinação contêm as bactérias lácticas, em particular uma ou mais bactérias do gênero *Lactobacillus spp.* e especialmente *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* e/ou *Lactobacillus casei* e/ou *Lactobacillus reuteri* e/ou *Lactobacillus acidophilus* e/ou *Lactobacillus helveticus* e/ou *Lactobacillus plantarum* e/ou
5 *bactérias do tipo Lactococcus cremoris* e/ou *Streptococcus thermophilus* e/ou *Lactococcus lactis* e/ou uma ou mais bactérias do gênero *Leuconostoc*.

De acordo com um modo de realização benéfico do procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado da invenção, a proporção das bifidobactérias nos fermentos de germinação é de
10 cerca de 20 a aproximadamente 75%, particularmente de cerca de 30 a aproximadamente 50%, particularmente de cerca de 35 a aproximadamente 40% e particularmente de cerca de 37,5%.

Por "proporção das bifidobactérias nos fermentos de germinação", entende-se a proporção das bifidobactérias com relação à
15 totalidade das bactérias inoculadas quando da etapa de germinação.

Esta proporção corresponde a uma otimização em termos de custo e de concentração final de bifidobactérias, ocorrendo que, quanto maior a concentração de bifidobactérias no início, mais elas aumentam a competição em termos de crescimento com relação às outras cepas dos
20 fermentos, e mais rapidamente a concentração ótima de bifidobactérias é alcançada.

De acordo com um modo de realização preferencial do procedimento de preparo de um produto alimentício fermentado da invenção, a matéria de partida é à base de sumo vegetal e particularmente de sumo de
25 fruta ou de sumo de legume, como o de soja, ou de produto lácteo, e, particularmente, de leite de vaca e/ou de leite de cabra.

A matéria de partida pode igualmente conter leite de ovelha e/ou leite de camelo e/ou leite de égua.

Caso o produto alimentício fermentado seja um produto
30 lácteo, a matéria de partida pode conter leite, leite em pó, açúcar, uma mistura

de leite e de sumo vegetal, uma mistura de leite e de sumo de fruta, uma mistura de leite e de amido.

Vantajosamente, o procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado de acordo com a invenção é tal que a matéria de partida pasteurizada é uma matéria de partida pasteurizada, reaquecida, facultativamente homogeneizada e resfriada, obtida a partir de uma matéria bruta, o referido procedimento compreendendo antes da etapa de germinação as seguintes etapas sucessivas:

- 5 - uma etapa de padronização em matéria gordurosa da matéria bruta de forma a obter uma matéria padronizada,
- uma etapa de enriquecimento em matéria seca da matéria padronizada obtida na etapa precedente, de forma a obter uma matéria enriquecida,
- 10 - uma etapa de pré-aquecimento da matéria enriquecida obtida na etapa precedente, de forma a obter uma matéria de partida,
- 15 - uma etapa de pasteurização e de reaquecimento da matéria de partida obtida na etapa precedente, de forma a obter uma matéria pasteurizada e reaquecida,
- 20 - uma etapa facultativa de homogeneização da matéria pasteurizada e reaquecida obtida na etapa precedente, de forma a obter uma matéria pasteurizada, reaquecida e facultativamente homogeneizada,
- uma etapa de resfriamento inicial da matéria pasteurizada, reaquecida e facultativamente homogeneizada obtida na etapa precedente, de forma a obter uma matéria de partida pasteurizada, reaquecida, facultativamente homogeneizada e resfriada.
- 25

Por "padronização em matéria gordurosa" entende-se uma etapa de nivelamento pré-determinada da quantidade de matéria gordurosa presente na matéria de partida.

O enriquecimento em matéria seca consiste no acréscimo de proteínas e de matéria gordurosa para modificar a firmeza do coalho.

O reaquecimento consiste em um aquecimento rápido do leite e permite destruir a flora microbiana vegetativa, das quais as formas patogênicas. Sua duração típica é de 4 a 10 minutos, particularmente de 5 a 8 minutos, e particularmente de cerca de 6 minutos.

Por "homogeneização" entende-se a dispersão da matéria gordurosa na matéria do tipo leite em pequenos glóbulos gordurosos. A homogeneização é efetuada, por exemplo, em uma pressão de 100 a 280 bar, particularmente de 100 a 250 bar, particularmente de 100 a 200 bar, particularmente de cerca de 200 bar. Esta etapa de homogeneização é meramente facultativa.

Ela está particularmente ausente no processo de produção de produtos com 0% de matéria gordurosa.

De acordo com um modo de realização particular, o procedimento de preparo de um produto alimentício fermentado tal como definido acima consiste em uma etapa de acondicionamento entre a etapa de germinação e a etapa de fermentação, a referida etapa de acondicionamento permitindo obter, a partir da matéria germinada obtida na etapa de germinação, uma matéria germinada e embalada.

Este modo particular de realização corresponde ao caso dos produtos alimentícios fermentados de tipo sólido.

Mais particularmente, o procedimento de preparo de um produto alimentício fermentado tal como definido acima inclui:

- uma etapa de germinação de uma matéria de partida, eventualmente pasteurizada, por inoculação de fermentos de germinação contendo cerca de 10^6 a aproximadamente $2 \cdot 10^8$, mais particularmente de cerca de 10^6 a aproximadamente 10^7 bifidobactérias por mL de partida, para obter uma matéria germinada,

- uma etapa de acondicionamento da matéria germinada obtida na etapa precedente, para obter uma matéria germinada acondicionada,

5 - uma etapa de fermentação da matéria germinada acondicionada obtida na etapa precedente, de forma que a temperatura de início de fermentação seja de cerca de 36 a aproximadamente 43°C, em particular de cerca de 37 a aproximadamente 40° C, a temperatura de fim de fermentação seja de cerca de 37 a aproximadamente 44° C, em particular de cerca de 38 a aproximadamente 41° C, e o tempo de fermentação seja de cerca de 6 a aproximadamente 11 horas, para obter uma matéria fermentada,

10 - uma etapa de resfriamento final da matéria fermentada obtida na etapa precedente, de forma que a temperatura de início de resfriamento final seja inferior a 22°C e a temperatura de fim de resfriamento final seja de cerca de 4 a aproximadamente 10° C para obter um produto alimentício fermentado.

15 De acordo com um modo alternativo de realização, que não se refira à preparação de produtos do tipo sólido, o procedimento de preparo de um produto alimentício fermentado de acordo com a invenção inclui as seguintes etapas sucessivas após a etapa de fermentação:

20 - uma etapa de resfriamento intermediário da matéria fermentada obtida na etapa de fermentação, de forma a obter uma matéria pré-resfriada,

- uma etapa de armazenamento da matéria pré-resfriada obtida na etapa precedente, de forma a obter uma matéria armazenada,

25 - uma etapa de resfriamento final da matéria armazenada obtida na etapa precedente, de forma a obter um produto alimentício fermentado.

30 De acordo com um modo de realização preferencial, a referida etapa de fermentação é tal que a temperatura de início de fermentação é de cerca de 36 a aproximadamente 43° C e, em particular, de cerca de 37 a aproximadamente 40° C, a temperatura de fim de fermentação é de cerca de

37 a aproximadamente 44° C e, em particular, de cerca de 38 a aproximadamente 41° C, e o tempo de fermentação é de cerca de 6 a aproximadamente 11 horas.

De maneira vantajosa, a referida etapa de resfriamento intermediário é tal que o tempo de resfriamento intermediário é de cerca de 1 hora a aproximadamente 4 horas e, em particular, de cerca de 1:30h a aproximadamente 2 horas e a temperatura de resfriamento intermediário é de cerca de 4 a aproximadamente 22° C.

De maneira preferencial, a referida etapa de armazenamento é tal que o tempo de armazenamento é inferior ou igual a aproximadamente 40 horas.

De maneira benéfica, a referida etapa de resfriamento final é tal que a temperatura de início de resfriamento final é inferior a aproximadamente 22° C e a temperatura de fim de resfriamento final é de cerca de 4 a aproximadamente 10° C.

De acordo com um modo de realização preferencial, o procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado de acordo com a invenção inclui:

- uma etapa de germinação de uma matéria de partida, eventualmente pasteurizada, por inoculação de fermentos de germinação contendo cerca de 10⁶ a aproximadamente 2.10⁸, mais particularmente de cerca de 10⁶ a aproximadamente 10⁷ bifidobactérias por mi (ou por grama) de matéria de partida, para obter uma matéria germinada,

- uma etapa de fermentação da matéria germinada obtida na etapa precedente, de forma que a temperatura de início de fermentação seja de cerca de 36 a aproximadamente 43° C, em particular de cerca de 37 a aproximadamente 40° C, a temperatura de fim de fermentação seja de cerca de 37 a aproximadamente 44° C, em particular de cerca de 38 a aproximadamente 41° C, e o tempo de fermentação seja de cerca de 6 a aproximadamente 11 horas, para obter uma matéria fermentada,

- uma etapa de resfriamento intermediário da matéria fermentada obtida na etapa precedente, de forma que o tempo de resfriamento intermediário seja de cerca de 1 a aproximadamente 4 horas, em particular de cerca de 1:30 h a aproximadamente 2 horas e a temperatura de resfriamento intermediário seja de cerca de 4 a aproximadamente 22° C, de forma a obter uma matéria pré-resfriada,

- uma etapa de armazenamento da matéria pré-resfriada obtida na etapa precedente, tal que o tempo de armazenamento seja inferior ou igual a aproximadamente 40 horas, de forma a obter uma matéria armazenada,

- uma etapa de resfriamento final da matéria armazenada obtida na etapa precedente, tal que a temperatura de início de resfriamento final seja inferior a aproximadamente 22° C e a temperatura de fim de resfriamento final seja de cerca de 4 a aproximadamente 10° C de forma a obter um produto alimentício fermentado.

De acordo com um modo de realização particular do procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado tal como definido acima, uma etapa suplementar de mistura está prevista entre a etapa de fermentação e a etapa de resfriamento intermediário, o que permite obter, a partir da matéria fermentada obtida na etapa de fermentação, uma matéria fermentada batida.

Por "mistura" entende-se um procedimento de agitação mecânica com o auxílio de um misturador com turbina ou com hélice. Trata-se de uma etapa determinante para a untuosidade do produto, especialmente o lácteo. Se a mistura for muito violenta, pode ocorrer uma entrada de ar e uma separação do soro. Se a mistura for insuficiente, o produto corre o risco de se tornar muito espesso.

De acordo com um modo de realização particular, o procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado de acordo com a invenção inclui após a etapa de resfriamento final uma etapa de

conservação do produto alimentício fermentado em uma temperatura compreendida entre cerca de 4 a aproximadamente 10° C.

A invenção se refere igualmente a um produto alimentício fermentado tal como obtido a partir do procedimento tal como definido acima.

5

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A figura 1 representa uma comparação dos efeitos da cisteína e da vitamina C na acidificação do leite pelo fermento do exemplo 1. Em abscissa consta o tempo em minutos, em coordenada o pH. Curva A: controle sem vitamina C nem cisteína; Curva B: Vitamina C; Curva C: cisteína.

10

A figura 2 representa a evolução da população de bifidobactérias no modelo de referência durante a conservação a 10° C. Em abscissa, o tempo de conservação em dias; em coordenada, a população de bifidobactérias em UFC/ml. D : com 15 mg/1 de cisteína filtrada; : sem cisteína.

15

A figura 3 representa a evolução da população de bifidobactérias no leite em função do tratamento do estimulante. Abscissa: tempo de conservação em dia; coordenada: população em UFC/ml. Condições: D controle sem cisteína nem metionina; r.a.á, cisteína autoclavada; •E, cisteína filtrada; 121, metionina autoclavada; curva em pontilhados, metionina filtrada.

20

A figura 4 representa a continuação da 15 população de bifidobactérias no modelo produzido durante a conservação a 10° C. Abscissa: tempo de conservação em dias;

- coordenada: população em UFC/ml. D cisteína a 12 mg/1 incorporada antes da pasteurização; : controle sem cisteína.

25

Exemplos

Exemplo 1: estudo do modo de ação da cisteína na qualidade de estimulante

Utiliza-se um fermento composto por *Streptococcus thermophilus* (CNCM: 1-1630) + *Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus*

(CNCM: 1-1632) + *Lactobacillus delbrueckii ssp.bulgaricus* (CNCM: 1-1519) + *Bifidobacterium animalis ssp lactis* (CNCM: 1-2494).

Trata-se neste exemplo de estudar o modo de ação da cisteína na qualidade de estimulante e de determinar se ela apresenta um efeito metabólico ou antioxidante.

O crescimento de bifidobactérias no leite é medido na presença de uma solução de vitamina C (0,5 gil) reduzindo totalmente o oxigênio do meio e de uma solução de cisteína (50 mg/l).

Constituição do modelo produzido:

Leite em pó desnatado Miledon fornecedor Arla food: 120 g
Água: quantidade suficiente para 1 kg

Faz-se um tratamento térmico consistente em uma pasteurização durante 30 minutos a 95° C em banho-maria fervente

A cisteína vem do fornecedor Sigma. A solução é preparada em 500 ml, filtrada em unidade de filtração Nalgene 0,2 µm (cat. 156-4020, Nalge Europe Ltd, Bélgica). Esta solução é utilizada injetada de forma estéril no modelo pasteurizado para uma concentração final de 50 mg/l.

A vitamina C vem do fornecedor Sigma. A solução é preparada em 100 ml, filtrada em unidade filtradora Nalgene 0,2 µm (cat. 156-4020, Nalge Europe Ltd, Bélgica). Esta solução é utilizada injetada de forma estéril no modelo pasteurizado para uma concentração final de 0,5 g/l.

As doses de germinação do modelo produzido são dadas no quadro 1 a seguir.

Quadro 1: doses de germinação

Volume por 1 l em µl

	Controle	Cisteína filtrada	Vitamina C
I-1630	100	100	100
I-1519 + I-1632	220	220	220
I-2494	190	190	190
Cisteína		100	
Vitamina C			5 ml

A germinação é de 5.106 UFC/ml de *Streptococcus thermophilus* e de 5.106 UFC/ml *Lactobacillus bulgaricus*.

5 A continuidade da acidificação do modelo a 37° C é representada no quadro 2 a seguir, bem como na figura 1.

Quadro 2: continuidade da acidificação do modelo

	Vitamina C	Cisteína filtrada	Controle
Ta	86	90	83
Vmax	-0,0079	-0,01046	-0,00791
pHm	5,96	5,82	6,06
Tmax	184	208	180
pH0	6,5	6,6	6,7
TpH 5,5	260	248	270
TpH 5	391	354	412
TpH 4,8	479	417	506
J0 UFC/ml	1,02.108	2,79. 108	1,47.108

Ta = tempo de latência (em minutos)

10

Vmax = velocidade máxima (em unidades ph/minuto)

pHm = pH na velocidade máxima de acidificação

Tmax = tempo em Vmax (em minutos)

pH0 = pH no início de fermentação

TpH 5,5 = tempo para chegar a pH 5,5 (em minutos)

15

TpH 5 = tempo para chegar a pH 5 (em minutos)

Tph 4,8 = tempo para chegar a pH 4,8 (em minutos)

JO UFC/ml = quantidade de bifidobactérias obtidas após fermentação.

Constata-se que a curva de acidificação em presença de cisteína se distingue da curva de acidificação em presença de vitamina C, sendo ela mesma quase indiscernível da curva de acidificação controle sem vitamina C nem cisteína. Considerando que a vitamina C é um antioxidante, deduz-se que o efeito estimulante da cisteína não é um efeito antioxidante, mas é mais certamente um efeito de aporte de aminoácido essencial.

Exemplo 2: determinação da dose de estimulante cisteína

Utiliza-se um fermento composto por *Streptococcus thermophilus* (CNCM: I-2272) + *Streptococcus thermophilus* (CNCM: I-2773) + *Streptococcus thermophilus* (CNCM: I-2130) + *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (CNCM: I-11519) + *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* (CNCM: I-2494).

"Modelos de leite" são constituídos por iogurtes batidos clássicos contendo o fermento descrito acima.

A utilização da cisteína filtrada 0,2 µ, foi avaliada nos "modelos de leite" nas proporções compreendidas de 5 mg/L a 50 mg/L (5 a 20 mg/L de maneira preferencial).

Para o método de numeração das bifidobactérias, reportamo-nos a M. Grand e al., Quantitative analysis and molecular identification of bifidobacteria strains in probiotic milk products, Eur. Food. Res. Technol. 217:90-92 (2003).

A população de bifidobactérias para o teste contendo a maior concentração de L cisteína é de 3.108 UFC/ml a J+24h, J correspondendo ao momento do acondicionamento do produto e permanece estável até 28 horas de conservação a 10° C.

A população do controle padrão (População controle JO: 1.108 UFC/ml) é de 9.107 UFC/ml em 28 dias de conservação a 10° C.

A população de bifidobactérias para o teste contendo a mais fraca concentração de L cisteína é de 1.108 UFC/ml em J+ 24 h.

Determinados produtos apresentam um falso paladar caracterizado como enxofre captado a partir de 0,002% de cisteína acrescentada. Abaixo desta concentração de cisteína, os produtos são aceitos: uma dose de 0,0015% representa o bom compromisso entre as especificações organolépticas e as especificações em termos de população de bifidobacterium > 2.108 UFC/ml.

Testes de crescimento no leite realizados na presença de 0,0015%, ou seja, 15 mg/L de cisteína filtrada, permitiram alcançar uma população de Bifidobacterium 1-2494 de 2.8.108 UFC/ml após 28 dias de conservação a 10° C (a evolução da população com relação ao controle sem cisteína é representada na figura 2).

Do ponto de vista de análise sensorial, os produtos realizados não apresentam falso gosto perceptível em comparação ao padrão.

Exemplo 3: cinética de acidificação

Utiliza-se o fermento descrito no exemplo 2.

As cinéticas de acidificação do leite na presença (15 mg/L) da dose ótima de cisteína e na ausência de cisteína (controle) mostram a ausência de efeito da cisteína na cinética global.

Exemplo 4: Efeito do tipo de tratamento do aminoácido sulfurado

Avalia-se o impacto da esterilização por filtração ou ajuste de temperatura da cisteína e da metionina (concentração final utilizada: 50 mg/1).

As soluções são ou filtradas a 0,2 µm, ou autoclavadas durante 5 minutos a 121° C, depois congeladas em forma de bolas no azoto líquido.

Constituição do modelo:

Leite em pó desnatado Miledex fornecedor Arla food: 120 g

Água: quantidade suficiente para 1 kg

Tratamento término: pasteurização durante 30 minutos a 95° C em banho-maria fervente

5 Cisteína: fornecedor Sigma. A solução é preparada em 500 g/l, filtrada em unidade de filtração Nalgene 0,2 µm ou esterilizada a 121° C durante 5 minutos por autoclave pilotada por sonda de temperatura (Feting France S.A., referência KL 60/101). Esta solução é injetada de forma estéril no modelo pasteurizado para uma concentração final de 50 mg/L.

10 Metionina: fornecedor Sigma. A solução é preparada em 300 g/l; o tratamento de filtração ou de esterilização é idêntico àquele efetuado para a solução de cisteína. Esta solução é injetada de forma estéril no modelo pasteurizado para uma concentração final de 50 mg/L.

As doses de germinação são apresentadas no quadro 3 a seguir.

15

Quadro 3: doses de germinação

Volume para 1 l em µl

	Controle	Cisteína filtrada	Cisteína autoclavada	Metionina filtrada	Metionina autoclavada
I-1630	100	100	100	100	00
I-1519+I-1632	220	220	220	220	20
I-2494	95	95	95	95	5
Cisteína filtrada		100			
Cisteína autoclavada			100		
Metionina filtrada				100	
Metionina autoclavada					00

A germinação é de 5.106 UFC/ml de *Streptococcus thermophilus* e de 5.106 UFC/ml de *Lactobacillus bulgaricus*.

A continuidade da população de bifidobactérias no modelo conservado a 4° C em função das diversas condições acima é representada na figura 3, bem como no quadro 4 a seguir:

Quadro 4: evolução da população de bifidobactérias

	J0 UFC/ml	J10 UFC/ml	J24 UFC/ml	J29 UFC/ml
Cisteína filtrada	5,1.108	4,3.108	4,0.108	2,3.108
Cisteína autoclavada	3,1.108	5,2.108	2,8.108	1,7.108
Metionina filtrada	4,0.108	6,2.108	3,4.108	2,3.108
Metionina autoclavada	3,4.108	3,5.108	3,5.108	2,8.108
Controle	1,7.108	7.107	5.107	2.107

O tempo de referência J0 corresponde à colocação em potes (embalagem). As medidas em J10, J24, J29 são efetuadas respectivamente 10 dias, 24 dias, 29 dias após esta colocação em potes.

Em todos os casos, a população de bifidobactérias aumento pelo aporte de cisteína ou metionina. Nenhum efeito do tratamento término é observável nas condições

1s de teste sobre a eficácia dos estimulantes. O tratamento término aplicável na cisteína em 50 mg/1 somente degrada uma parte, sendo a concentração residual (não avaliada) suficiente para melhorar a população de bifidobactérias.

Exemplo 5: evolução da população de bifidobactérias durante a conservação em caso de incorporação de cisteína antes de pasteurização

A dose de 12 mg/1 de cisteína é definida como efeito estimulante respondendo ao volume de população (2.108 UFC/ml) e

respondendo positivamente em termos organoléticos (sem diferença detectável). Esta concentração foi avaliada em

- incorporação direta na composição modelo e pasteurizada (95° C, 30 min.).

5 A continuidade da população de bifidobactérias no modelo produzido durante a conservação em 10° C está representada na figura 4.

A população de Bifidobacterium é de 2,4.108

15 UFC/ml em J1 (ou seja, 24 h de armazenamento) e permanece estável após 44 dias de conservação a 10° C (acima de 1,4. 108

10 - UFC/ml). O efeito estimulante é claramente demonstrado com relação ao controle padrão (1,6. 108 UFC/ml em J1; 7,65. 107

UFC/ml em J8; 2. 107 UFC/ml em J28; 1,8. 107 UFC/ml

em J35;

8,5. 106 UFC/ml em J44) nestas condições: a população

15 em J0 é maior quando se utilizam os aminoácidos sulfurados e a manutenção da população ao longo da vida do produto melhora bastante. Este efeito estimulante permanece entretanto menos eficaz que o acréscimo de cisteína filtrada 0,2 µm no modelo (3, 108 UFC/ml), acarretando o tratamento término uma degradação da cisteína (concentração residual inferior a 15 mg/1).

20 Uma

superdosagem inicial da quantidade de cisteína será prevista no caso em que a cisteína sofra um tratamento térmico.

Conclusões relativas às condições de utilização da cisteína:

25 - a utilização da cisteína diretamente filtrada (com o fermento) preserva a cisteína;

- seu acréscimo na composição do modelo tratado termicamente dá um resultado um pouco pior em termos

30 • de população, mais deve-se levar em consideração a degradação da cisteína quando do tratamento térmico (menos disponível);

- seu acréscimo através de um ingrediente lácteo (por exemplo, GlicoMacroPeptídeo correspondente ao fragmento 106-169 da caseína kappa) tratado termicamente dá menos bons resultados (menos disponível);

5 - seu acréscimo em forma congelada com o fermento é possível.

- Exemplo 6: fabricação de um iogurte batido gorduroso de acordo com a invenção em escala de laboratório (micro-fabricação):

20 Composição do leite e reidratatação

10 O iogurte batido é composto pelos seguintes ingredientes: leite desnatado com 0% de matérias gordurosas, creme com 40% de matérias gordurosas e leite em pó desnatado (PLE) com 33% de proteínas.

Em um primeiro momento, todos os ingredientes são associados em conjunto para padronizar o leite

15 com uma taxa protéica (TP) de 4,4 %, uma taxa de matérias gordurosas (MG) de 3,5% e uma taxa de matérias secas de 15,8% com agitação do meio durante 60 minutos com cerca de 750 giros/min com um agitador HEIDOLPH® para que as proteínas

5 se reidratem.

20 O controle da padronização é efetuado com detector infravermelho MILKOSCAN FT 120® da sociedade FOSS®. Abaixo, um exemplo das quantidades necessárias de

#1 cada ingrediente para obter os volumes que caracterizam o leite.

25 Ingredientes Em%

Leite

desnatado 0% MG 87,5

Creme a 40%

MG 8,7

30 Proteínas de

leite desnatado 33% TP 3,8

TOTAL 100

2. Homogeneização

O leite é então aquecido entre 50° e 60° C para fundir bem os glóbulos de gordura. Uma vez que a temperatura seja atingida, os 10 litros são homogeneizados no MICROFLUIDIZER® da sociedade MICROCORPS®. Isto permite quebrar os glóbulos de gordura, passando o leite em capilares através de uma grade e sob uma pressão de 350 Bars.

Pasteurização

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.

As garrafas são imersas até a parte de baixo do gargalo em 103° C durante 35 minutos, depois 10 minutos a 95° C

• no mesmo banho-maria.

4. Resfriamento e armazenamento

As garrafas são resfriadas em um banho de água fria em fluxo contínuo, depois armazenadas a 4° C no refrigerador de 12 a 24 horas, de acordo com o planejamento previsto no teste.

5. Reaquecimento

As garrafas de leite são retiradas do refrigerador 45 minutos antes da inoculação dos fermentos e colocadas em

- banho-maria em temperatura de fermentação considerada, ou seja 37°C.

6. Fermentação

Após inoculação dos fermentos (5.106 UFC/ml de *Streptococcus thermophilus*; 5.106 UFC/ml de *Lactobacillus bulgaricus*; 5.106 UFC/ml de bifidobactérias) e a L-cisteína (15 mg/1) em temperatura de fermentação 37° C, as garrafas são novamente mergulhadas em banho-

maria e a acidificação é acompanhada pelo CINAC® da sociedade YSEBAERT® até um pH de 4,8.

7. Retirada de coágulos e alisamento

A retirada de coágulos da garrafa é feita à mão. O iogurte sem coágulos é colocado na rampa da plataforma de alisamento. O alisamento é feito através de uma grade metálica de porosidade 500 microns e o produto alisado é resfriado a 20° C através de um circuito de troca em água gelada.

8. Embalagem e armazenamento

A embalagem é feita manualmente em potes de 125 ml e a tampa é lacrada com lacradora DNV-100-25 PPV-A® da sociedade FESTO®. Os produtos são armazenados em câmara fria 10° C durante todo o teste.

Exemplo 7: Avaliação da dose de cisteína a acrescentar para obter um produto de boa qualidade organolética e contendo a população desejada de Bifidobactérias (ÓJ-y

Diferentes produtos foram preparados com doses crescentes de cisteína (ver o quadro abaixo).

O controle foi o produto lácteo clássico contendo o fermento.

Gama:
Volume/ IL dose Cisteína
3,2mL 0,0080% 80 mg/L
2mL 0,0050% 50 mg/1,
0,8 nL 0,0020% 20 mg/L
0,4mL 0,0010% 10 mg/L
0,2mL 0,0005% 5 mg/L

Cada produto foi provado por 4 pessoas que conhecem muito bem o produto de referência do ponto de vista organolético. Estas pessoas deram sua opinião em termos de presença de mau paladar (gosto de enxofre, acidez), sendo a referência o produto clássico não contendo cisteína.

Resultados

0,0015%

3,10E+06 1,50E+08 2,40E+08 Nenhuma
detecção de mau paladar

5

0,001%

6 3,90E+06 1,10E+08 1,20E+08 Nenhuma
detecção de mau paladar

0,0005%

10 Não sendo a dose de 0,0015% ainda ótima do ti ponto de vista organolético, a dose de 0,00125% foi testada. Esta dose representa um compromisso muito bom entre a especificação em termos de manutenção de população e a especificação em termos de qualidade organolética.

15 O perfil sensorial de um produto adicionado com 0,00125% (12,5 mg/1) de cisteína foi realizado por uma banca de peritos treinados para este tipo de degustação composto por 15 pessoas.

20 - Duas repetições foram efetuadas. Os degustadores tinham que julgar o produto em 23 itens. Os resultados destes itens (essenciais para definir a qualidade organolética do produto com relação ao produto de referência) não demonstraram diferença significativa nociva nestes itens. Estes itens foram os seguintes:

Aspecto no produto

- Soro visual (avaliação visual da quantidade de soro na superfície do produto)

25

produto

Textura da colher antes da misturação do produto

- Impressão (apura a estabilidade da estrutura do Textura da colher antes da misturação do

- Espessura (resistência para deslocamento da colher)

• dorso da colher)

30

- Fio (continuidade do fio de escoamento)

- Cobertura (quantidade de produto que cobre o
 Textura na boca após misturação do produto
 - Fugaz (velocidade de desaparecimento do produto na
 boca)

- 5
- Revestimento (reveste a parede bucal)
 - Gorduroso (sensação de gordura na boca)
 - Doce (sensação de doçura na boca)

Sabores

- 10
- Ácido
 - Açucarado
 - Amargo
 - Adstringente

Aromas do leite

- 15
- Gosto desagradável
 - Creme
 - Manteiga
 - Leite
 - Queijo fresco
 - Acetaldeído
- 20
- Soro de leite
 - Lactona
 - Limão
 - Batata

25 O resultado pesquisado é uma ausência de
 diferença significativa entre o produto de referência e o produto
 suplementado com a cisteína.

No caso presente, um produto de acordo com a invenção,
 suplementado com 12,5 mg/1 de cisteína não apresenta diferença significativa
 em termos de aspecto, de textura, de sabores e de paladares com relação ao
 30 produto de referência.

REIVINDICAÇÕES

1. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado a partir de uma matéria de partida, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

- uma etapa de inoculação de uma matéria de partida, opcionalmente pasteurizada, por inoculação de fermentos de inoculação contendo bifidobactérias, *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*, livre de *Lactobacillus acidophilus* para obter uma matéria inoculada,

- uma etapa de fermentação da matéria inoculada obtida na etapa precedente, de forma a obter uma matéria fermentada,

- uma etapa de incorporação de pelo menos um aminoácido sulfurado em forma livre em concentração de 5 a 30 mg/L, em particular de 5 a 20 mg/L, em particular 10 a 15 mg/L, em particular de 12 a 15 mg/L, e em particular 12,5 mg/L, esta etapa de incorporação podendo ocorrer

- seja antes da etapa de inoculação,

- seja simultaneamente à etapa de inoculação,

- ou após a etapa de inoculação e antes da etapa de fermentação, desde que o produto alimentício fermentado contenha até 0,5% (p/p) de extrato de levedura e/ou de autolisado de levedura, referido produto alimentício fermentado seja livre de sabor tipo sulfuroso e contenha mais do que $5,10^7$ UFC, em particular mais de 10^8 UFC, por grama de produto alimentício fermentado durante um período de conservação de pelo menos 30 dias.

2. Procedimento, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

- uma etapa de inoculação de uma matéria de partida, opcionalmente pasteurizada, por inoculação de fermentos de inoculação contendo bifidobactérias, para obter uma matéria inoculada,

- uma etapa de fermentação da matéria inoculada obtida na etapa precedente, de forma a obter uma matéria fermentada,

- uma etapa de incorporação de pelo menos um aminoácido sulfurado em forma livre em concentração de 5 a 30 mg/L, em particular de 5 a 20 mg/L, em particular 10 a 15 mg/L, em particular de 12 a 15 mg/L, e particularmente 12,5 mg/L, esta etapa de incorporação podendo ocorrer

- seja antes da etapa de inoculação,

- seja simultaneamente à etapa de inoculação,

- ou após a etapa de inoculação e antes da etapa de fermentação.

3. Procedimento, de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma etapa de adição de substâncias adicionais contendo um ou mais aminoácidos contendo enxofre na forma livre, a concentração de aminoácidos contendo enxofre na forma livre nas substâncias suplementares inferior a 0,5% e a concentração das referidas substâncias suplementares no produto alimentício fermentado sendo inferior a 0,5%.

4. Procedimento, de acordo com a reivindicação 1 ou 3, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma etapa de acréscimo de substâncias suplementares constituídas por um extrato de levedura e/ou por um autolisado de levedura e/ou hidrolisado de proteínas de leite, de vegetais, de soja, em uma concentração inferior a 0,5% (p/p).

5. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizado** pelo fato de que compreende igualmente uma etapa de pasteurização que ocorre antes da etapa de inoculação, permitindo obter uma matéria de partida pasteurizada a partir da matéria de partida.

6. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que a

etapa de incorporação de pelo menos um aminoácido sulfurado ocorre antes da etapa de pasteurização, sendo o ou os aminoácidos sulfurados incorporados em uma concentração de 5 a 30 mg/L, em particular de 10 a 15 mg/L, em particular de 12 a 15 mg/L e particularmente 12,5 mg/L.

7. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que a etapa de incorporação de pelo menos um aminoácido sulfurado ocorre, simultaneamente à etapa de inoculação, sendo o ou os aminoácidos sulfurados incorporados em uma concentração de 5 a 30 mg/L, em particular de 5 a 20 mg/L, em particular de 10 a 15 mg/L, em particular de 12 a 15 mg/L e em particular 12,5 mg/L.

8. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizado** pelo fato de que a etapa de incorporação de pelo menos um aminoácido sulfurado ocorre após da etapa de inoculação e antes da etapa de fermentação, sendo o ou os aminoácidos sulfurados incorporados em uma concentração I de 5 a 30 mg/L, em particular de 5 a 20 mg/L, em particular de 10 a 15 mg/L, em particular I de 12 a 15 mg/L e em particular 12,5 mg/L.

9. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma etapa de acréscimo de uma preparação intermediária simultaneamente à etapa de inoculação ou entre a etapa de inoculação e a etapa de fermentação, de forma a obter, a partir da matéria inoculada, uma matéria inoculada completada, ou após a etapa de fermentação, de forma a obter, a partir da matéria fermentada, uma matéria fermentada completada, a referida preparação intermediária contendo uma preparação de frutas e/ou de cereais e/ou de aditivos tais como aromas e corantes, podendo a referida etapa de acréscimo de uma preparação intermediária ocorrer simultaneamente à etapa de incorporação de pelo menos um aminoácido sulfurado.

10. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizado** pelo fato de que a etapa de inoculação compreende a inoculação de fermentos de inoculação contendo 10^6 a $2,10^8$ UFC, mais particularmente de 10^6 a 10^7 UFC, por mL de matéria de partida.

11. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizado** pelo fato de que as bifidobactérias são selecionadas dentre as bactérias do tipo *Bifidobacterium animalis*, particularmente *Bifidobacterium animalis animalis* e/ou *Bifidobacterium animalis lactis* e/ou *Bifidobacterium breve* e/ou *Bifidobacterium longum* e/ou *Bifidobacterium infantis* e/ou *Bifidobacterium bifidum*.

12. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, **caracterizado** pelo fato de que as bifidobactérias são selecionadas dentre as bactérias do tipo *Bifidobacterium animalis*.

13. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, **caracterizado** pelo fato de que a proporção das bifidobactérias nos fermentos de inoculação é de 20 a 75%, particularmente de 30 a aproximadamente 50%, particularmente de 35 a 40% e particularmente de 37,5%.

14. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, **caracterizado** pelo fato de que a matéria de partida é à base de sumo vegetal e particularmente de sumo de fruta ou de sumo de legume, tal como de suco de soja, ou de produto lácteo, e, particularmente, de leite de vaca e/ou de leite de cabra.

15. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a

14, **caracterizado** pelo fato de que a matéria de partida é uma matéria de partida pasteurizada, reaquecida, facultativamente homogeneizada e resfriada, obtida a partir de uma matéria bruta, o referido procedimento compreendendo antes da etapa de inoculação as seguintes etapas sucessivas:

- uma etapa de padronização em matéria gordurosa da matéria bruta de forma a obter uma matéria padronizada,

- uma etapa de enriquecimento em matéria seca da matéria padronizada obtida na etapa precedente, de forma a obter uma matéria enriquecida,

- uma etapa de pré-aquecimento da matéria enriquecida obtida na etapa precedente, de forma a obter uma matéria de partida,

- uma etapa de pasteurização e de reaquecimento da matéria de partida obtida na etapa precedente, de forma a obter uma matéria pasteurizada e reaquecida,

- uma etapa facultativa de homogeneização da matéria pasteurizada e reaquecida obtida na etapa precedente, de forma a obter uma matéria pasteurizada, reaquecida e facultativamente homogeneizada,

- uma etapa de resfriamento inicial da matéria pasteurizada, reaquecida e facultativamente homogeneizada obtida na etapa precedente, de forma a obter uma matéria de partida pasteurizada, reaquecida, facultativamente homogeneizada e resfriada.

16. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado de tipo firme, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma etapa de acondicionamento entre a etapa de inoculação e a etapa de fermentação, a referida etapa de acondicionamento permitindo obter, a partir da matéria inoculada obtida na etapa de inoculação, uma matéria inoculada e acondicionada.

17. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

- uma etapa de inoculação de uma matéria de partida, eventualmente pasteurizada, por inoculação de fermentos de inoculação contendo 10^6 a $2,10^8$ UFC, mais particularmente de 10^6 a 10^7 UFC por mL de partida, para obter uma matéria inoculada,

- uma etapa de acondicionamento da matéria inoculada obtida na etapa precedente, para obter uma matéria inoculada acondicionada,

- uma etapa de fermentação da matéria inoculada acondicionada obtida na etapa precedente, de forma que a temperatura de início de fermentação seja de 36 a 43° C, em particular de 37 a 40° C, a temperatura de fim de fermentação seja de 37 a 44° C, em particular de 38 a 41° C, e o tempo de fermentação seja de 6 a 11 horas, para obter uma matéria fermentada,

- uma etapa de resfriamento final da matéria fermentada obtida na etapa precedente, de forma que a temperatura de início de resfriamento final seja inferior a 22° C e a temperatura de fim de resfriamento final seja de 4 a 10° C para obter um produto alimentício fermentado.

18. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, **caracterizado** pelo fato de que compreende as seguintes etapas sucessivas após a etapa de fermentação:

- uma etapa de resfriamento intermediário da matéria fermentada obtida na etapa de fermentação, de forma a obter uma matéria pré-resfriada,

- uma etapa de armazenamento da matéria pré-resfriada obtida na etapa precedente, de forma a obter uma matéria armazenada,

- uma etapa de resfriamento final da matéria armazenada obtida na etapa precedente, de forma a obter um produto alimentício fermentado.

19. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15 ou 18, **caracterizado** pelo fato de que a referida etapa de fermentação é tal que a temperatura de início de fermentação é de 36 a 43° C e, em particular, de 37 a 40° C, a temperatura de fim de fermentação é de 37 a 44° C e, em particular, de 38 a 41° C, e o tempo de fermentação é de 6 a 11 horas.

20. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 ou 19, **caracterizado** pelo fato de que a etapa de resfriamento intermediário é tal que o tempo de resfriamento intermediário é de 1 hora a 4 horas e, em particular, de 1:30 h a 2 horas e a temperatura de resfriamento intermediário é de 4 a 22° C.

21. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 20, **caracterizado** pelo fato de que a etapa de armazenamento é tal que o tempo de armazenamento é inferior ou igual a 40 horas.

22. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 21, **caracterizado** pelo fato de que a etapa de resfriamento final é tal que a temperatura de início de resfriamento final é inferior a 22° C e a temperatura de fim de resfriamento final é de 4 a 10° C.

23. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15 ou 18 a 22, **caracterizado** pelo fato de que compreende:

- uma etapa de inoculação de uma matéria de partida, eventualmente pasteurizada, por inoculação de fermentos de inoculação

contendo 10^6 a $2,10^8$ UFC, mais particularmente de 10^6 a 10^7 UFC por mL de matéria de partida, para obter uma matéria inoculada,

- uma etapa de fermentação da matéria inoculada obtida na etapa precedente, de forma que a temperatura de início de fermentação seja de 36 a 43° C, em particular de 37 a 40° C, a temperatura de fim de fermentação seja de 37 a 44° C, em particular de 38 a 41° C, e o tempo de fermentação seja de 6 a 11 horas, para obter uma matéria fermentada,

- uma etapa de resfriamento intermediário da matéria fermentada obtida na etapa precedente, de forma que o tempo de resfriamento intermediário seja de 1 a 4 horas, em particular de 1:30 h a 2 horas e a temperatura de resfriamento intermediário seja de 4 a 22° C, de forma a obter uma matéria pré-resfriada,

- uma etapa de armazenamento da matéria pré-resfriada obtida na etapa precedente, tal que o tempo de armazenamento seja inferior ou igual a 40 horas, de forma a obter uma matéria armazenada,

- uma etapa de resfriamento final da matéria armazenada obtida na etapa precedente, tal que a temperatura de início de resfriamento final seja inferior a 22° C e a temperatura de fim de resfriamento final seja de 4 a 10° C de forma a obter um produto alimentício fermentado.

24. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 23, **caracterizado** pelo fato de que compreende uma etapa suplementar de misturação entre a etapa de fermentação e a etapa de resfriamento intermediário, o que permite obter, a partir da matéria fermentada obtida na etapa de fermentação, uma matéria fermentada batida.

25. Procedimento de preparação de um produto alimentício fermentado, de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 24, **caracterizado** pelo fato de que inclui após a etapa de resfriamento final, uma etapa de conservação do produto alimentício fermentado em uma temperatura compreendida entre cerca de 4 a 10°C.

03

1/4

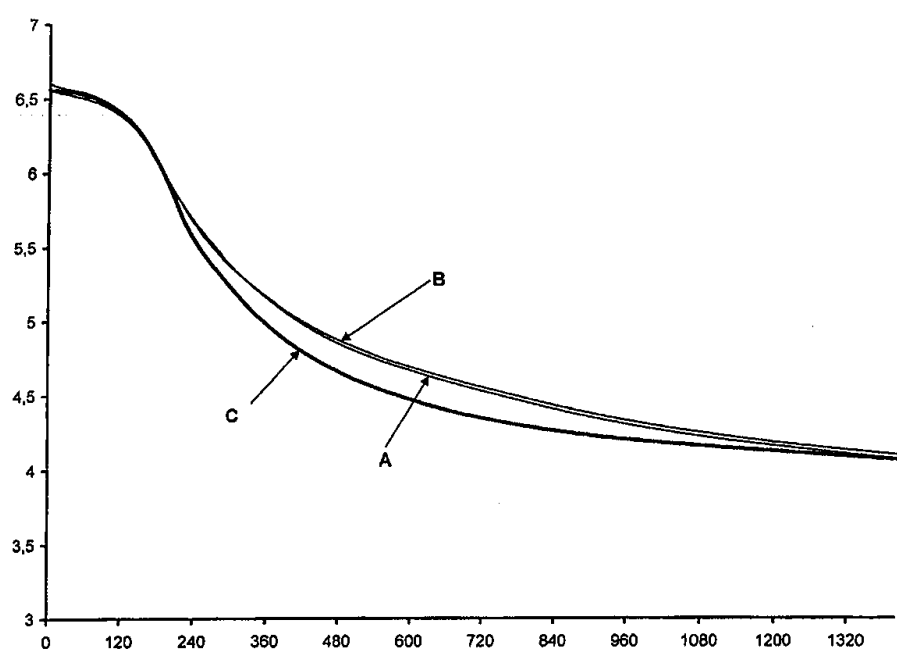


Figura 1

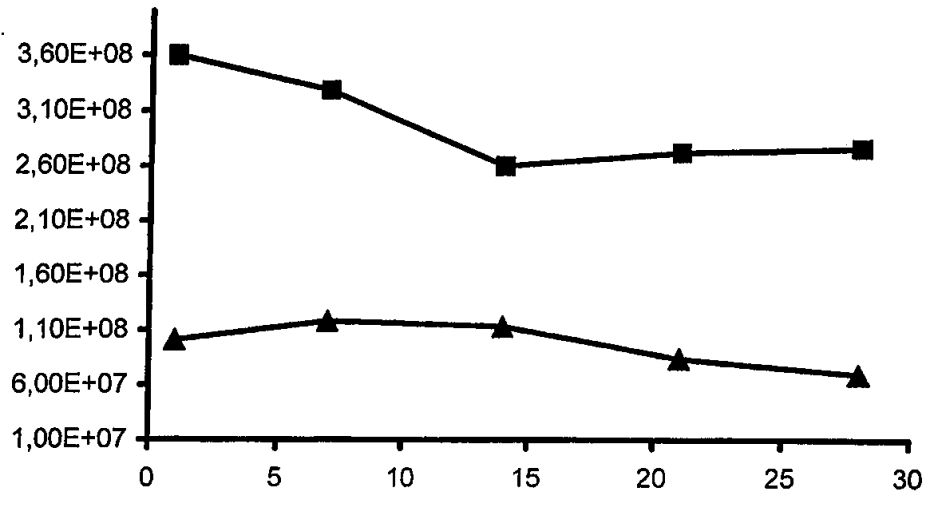


Figura 2

07
m

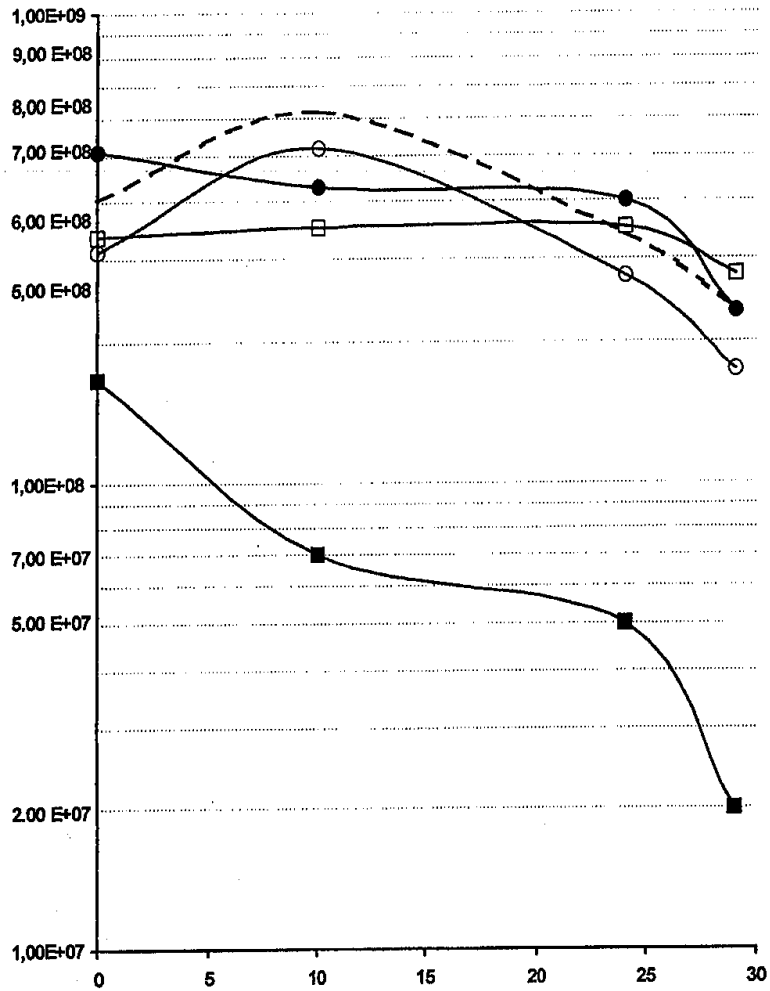


Figura 3

08m

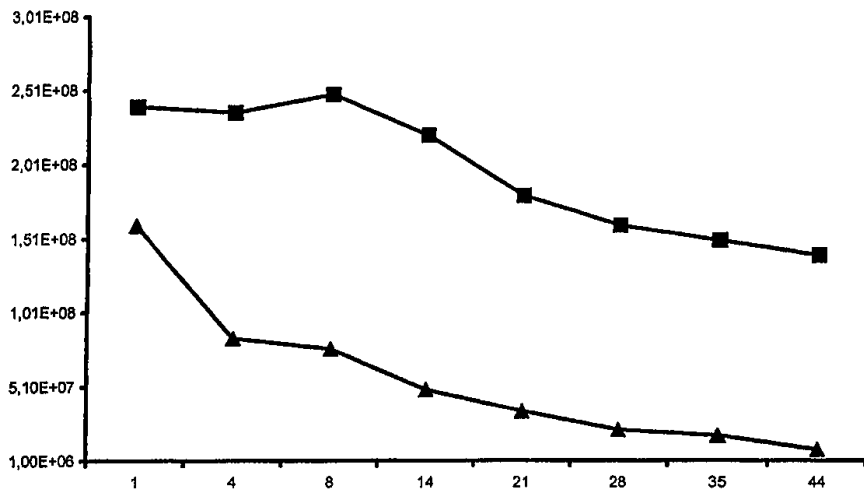


Figura 4