



* B R 1 2 2 0 1 8 0 1 3 7 1 3 B 1 *

República Federativa do Brasil

Ministério do Desenvolvimento, Indústria,
Comércio e Serviços

Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) BR 122018013713-4 B1

(22) Data do Depósito: 30/08/2016

(45) Data de Concessão: 23/01/2024

(54) Título: COMPOSIÇÃO, ALIMENTO, RAÇÃO OU PRODUTO FARMACÊUTICO, BEM COMO MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE UM PRODUTO LÁCTEO FERMENTADO, ALIMENTO, RAÇÃO OU PRODUTO FARMACÊUTICO E USO DA BACTÉRIA DA ESPÉCIE LACTOBACILLUS RHAMNOSUS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

(51) Int.Cl.: C12N 1/20; A23C 9/123; A61K 35/747; A23L 29/00; C12R 1/225.

(30) Prioridade Unionista: 31/08/2015 EP 15183198.9.

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

(72) Inventor(es): CECILIE LYKKE MARVIG NIELSEN; TINA HORNBAEK; PIA RASMUSSEN; LONE POULSEN; THOMAS ECKHARDT; GUNNAR OEREGAARD; ELAHE GHANEI MOGHADAM.

(86) Pedido PCT: PCT EP2016070381 de 30/08/2016

(87) Publicação PCT: WO 2017/037046 de 09/03/2017

(85) Data do Início da Fase Nacional: 04/07/2018

(62) Pedido Original do Dividido: BR112018003018-0 - 30/08/2016

(57) Resumo: BACTÉRIAS LACTOBACILLUS RHAMNOSUS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, USO DA MESMA, COMPOSIÇÃO, ALIMENTO, RAÇÃO OU PRODUTO FARMACÊUTICO, BEM COMO MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE UM PRODUTO LÁCTEO FERMENTADO, UM ALIMENTO, RAÇÃO OU PRODUTO FARMACÊUTICO A presente invenção refere-se a uma bactéria da espécie Lactobacillus fermentum tendo a capacidade de inibir o crescimento do fungo Penicillium solitum depositado sob o No. de acesso: DSM32093 ou o crescimento do fungo Penicillium brevicompactum depositado sob o No. de acesso: DSM32094 por, pelo menos, 50%. A atividade inibitória pode ser determinada em um ensaio compreendendo: (1) preparar um produto lácteo fermentado por: (a) inoculação de um leite com o Lactobacillus fermentum em uma concentração de pelo menos 107 UFC/g e com uma cultura iniciadora; (b) fermentação até um pH de 4,6 ser atingido, e (c) solidificação do leite fermentado por adição de ágar; (2) gerar pelo menos uma mancha de P. solitum ou P. brevicompactum sobre o ágar do leite fermentado solidificado com uma concentração de 500 esporos/mancha e incubando o mesmo por 7 dias a 25°C; (3) determinar a porcentagem de inibição por determinação do maior diâmetro da colônia formada pelo crescimento de P. solitum ou P. brevicompactum e expressando o diâmetro como porcentagem do maior diâmetro formado sob as mesmas (...).

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"COMPOSIÇÃO, ALIMENTO, RAÇÃO OU PRODUTO FARMACÊUTICO, BEM COMO MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE UM PRODUTO LÁCTEO FERMENTADO, ALIMENTO, RAÇÃO OU PRODUTO FARMACÊUTICO E USO DA BACTÉRIA DA ESPÉCIE LACTOBACILLUS RHAMNOSUS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA".

Dividido do BR112018003018-0, depositado em 30.08.2016.

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se a bactérias *Lactobacillus fermentum* com atividade antifúngica, composições compreendendo as bactérias, em especial as culturas auxiliares compreendendo as bactérias, métodos de produção de um produto lácteo fermentado com as bactérias ou as culturas e os produtos lácteos fermentados assim obtidos, incluindo alimentos, rações e produtos farmacêuticos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] Bactérias formadoras de ácido láctico (LAB) têm sido utilizadas por décadas para aumentar a vida útil de produtos alimentícios. Durante a fermentação, LAB produzem ácido láctico, assim como outros ácidos orgânicos que provocam uma redução do pH do produto fermentado. Os produtos com um pH ácido não suportam o crescimento da maioria dos microrganismos, incluindo bactérias patogênicas e de deterioração. No entanto, o crescimento de leveduras e bolores não é afetado pelo pH baixo e, muitas vezes, causa a deterioração dos produtos lácteos fermentados.

[003] Além da produção de ácidos orgânicos algumas LAB também produzem metabólitos com atividade antimicrobiana e em particular antifúngica.

[004] Por exemplo, o Pedido de Patente Europeia Nº. EP0221499 descreve as propriedades antifúngicas de *Lactobacillus rhamnosus* NRRL- B-15972, que são capazes de inibir o crescimento de diferentes

bolores quando cultivadas em meio ágar suplementado com suco de pepino. Da mesma forma, o Pedido de Patente Europeia Nº. EP0576780 se refere a *Lactobacillus rhamnosus* LC-705, uma cepa que aparentemente inibe o crescimento de *Penicillium*, *Cladosporium*, *Fusarium* e *Candida* num meio de base lactoserum, suplementado com hidrolisado de caseína e com extrato de levedura. O Pedido de Patente Europeia Nº. EP1442113 descreve as misturas de *Propionibacterium jensenii* e *Lactobacillus* sp., como *Lactobacillus rhamnosus*, com efeitos antimicrobianos e sua utilização para bioproteção. O Pedido de Patente Europeia Nº. EP13717237 descreve as cepas de *Lactobacillus paracasei* com efeito antifúngico e o Pedido de Patente Europeia Nº. EP13714671 descreve as cepas de *Lactobacillus rhamnosus* com efeito antifúngico.

[005] Uma visão geral de LAB com efeitos antifúngico e seu uso para a proteção de pão e frutas é fornecida por Gerez *et al.*, 2013.

[006] Culturas com efeitos antifúngicos estão disponíveis comercialmente e incluem culturas FreshQ® de Chr. Hansen, bem como culturas de Dupont, SACCO e Bioprox. O desenvolvimento de culturas com efeitos antifúngico representa um grande desafio, e requer a identificação de culturas que oferecem efeito antifúngico significativo em aplicações alimentares reais. Outro fator que necessita de avaliação criteriosa na seleção de candidatos de cultura bioprotetora, é o efeito nas propriedades sensoriais do produto alimentar. Um problema que foi identificado nos produtos comerciais é a dimensão de pós-acidificação, ou seja, a continuação da acidificação da cultura após o produto atingir o pH desejado. Isto representa um problema em particular em altas temperaturas de armazenamento, durante a manipulação do produto fermentado em tanques de fermentação antes de refrigeração do produto ou durante as etapas de maturação.

[007] As culturas comerciais bioprotetoras foram ainda consideradas para produzir componente de sabor excessivo de diacetil causando

um sabor "cremoso" que pode ser percebido como um impacto de sabor indesejável (Aunbjerg *et al.*, 2015).

[008] Por conseguinte, há ainda uma necessidade de novas e vantajosas bactérias de grau alimentício com efeitos antifúngico e mínimo impacto do sabor.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[009] A presente invenção fornece bactérias da espécie *Lactobacillus fermentum* tendo a capacidade de inibir o crescimento do fungo *Penicillium solitum* depositado sob o N°. de acesso: DSM32093 ou o crescimento do fungo *Penicillium brevicompactum* depositado sob o No. de acesso: DSM32094 por, pelo menos, 50%.

[0010] Por um esforço dedicado, um novo grupo de cepas de *Lactobacillus fermentum* foi identificado que fornece efeitos antifúngicos significativos e vantagens adicionais quando usado como uma cepa bioprotetora em métodos de produção de produtos fermentados. Um total de 10 cepas diferentes de *Lactobacillus fermentum* foram identificadas que inibem o crescimento de *P. solitum* ou *P. brevicompactum* por, pelo menos, 50%.

[0011] As cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção podem ainda ser caracterizadas por ter a capacidade de reduzir a concentração de acetaldeído produzido por uma cultura iniciadora durante a fermentação em um produto lácteo fermentado por, pelo menos, 50%.

[0012] Em uma modalidade relacionada, as cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção podem ser caracterizadas pelo fato de que a bactéria secreta apenas quantidades baixas de diacetil, por exemplo, na faixa de 0 a 5 ppm.

[0013] As cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção podem, alternativa ou adicionalmente, ser caracterizadas pelo fato de que elas aumentam o pH de um produto lácteo fermentado com *Lactobacillus fermentum* durante o armazenamento após fermentação em

comparação com um produto lácteo fermentado com a mesma cultura iniciadora não contendo *Lactobacillus fermentum*.

[0014] A presente invenção, portanto, fornece as bactérias como descrito acima, as composições compreendendo as mesmas, métodos utilizando as bactérias para a produção de produtos lácteos fermentados, bem como os produtos obtidos dessa forma.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0015] A presente invenção fornece uma bactéria da espécie *Lactobacillus fermentum* tendo a capacidade de inibir o crescimento do fungo *Penicillium solitum* depositado sob o N° de acesso: DSM32093 ou o crescimento do fungo *Penicillium brevicompactum* depositado sob o N° de acesso: DSM32094 por, pelo menos, 50%. Em uma modalidade preferida, a presente invenção se refere a uma bactéria da espécie *Lactobacillus fermentum* tendo a capacidade de inibir o crescimento do fungo *Penicillium solitum* depositado sob o N° de acesso: DSM32093 ou o crescimento do fungo *Penicillium brevicompactum* depositado sob o N° de acesso: DSM32094 em pelo menos 50% quando cultivada em leite ou um substrato à base de leite, como por exemplo, um produto lácteo fermentado. A capacidade de inibir o crescimento de um fungo pode ser determinada por inúmeros ensaios diferentes conhecidos na técnica. No contexto da presente invenção, a capacidade de inibir o crescimento do fungo *Penicillium solitum* depositado sob o N° de acesso: DSM32093 ou o crescimento do fungo *Penicillium brevicompactum* depositado sob o N° de acesso: DSM32094 por, pelo menos, 50% é determinada de preferência através de um ensaio compreendendo:

preparar um produto lácteo fermentado por:

inoculação de um leite com o *Lactobacillus fermentum* em uma concentração de pelo menos 10^7 UFC/g e com uma cultura iniciadora,

fermentação até um pH de 4,6 ser atingido, e

solidificação do leite fermentado por adição de ágar;
gerar pelo menos uma mancha de *P. solitum* ou *P. brevicompactum* sobre o ágar do leite fermentado solidificado com uma concentração de 500 esporos/mancha e incubando o mesmo por 7 dias a 25°C;
determinar a porcentagem de inibição por determinação do maior diâmetro da colônia formada pelo crescimento de *P. solitum* ou *P. brevicompactum* e expressando o diâmetro como porcentagem do maior diâmetro formado sob as mesmas condições, mas na ausência da cepa *Lactobacillus fermentum*.

[0016] As cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção têm vantagens específicas uma vez que elas aumentam a estabilidade de armazenamento de produtos alimentícios feitos com essas bactérias. Em uma alternativa, as cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção inibem o crescimento do fungo *Penicillium solitum* depositado sob o N° de acesso: DSM32093 e o crescimento do fungo *Penicillium brevicompactum* depositado sob o N° de acesso: DSM32094 por, pelo menos, 50%. Em uma modalidade relacionada, as cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção inibem o crescimento do fungo *Penicillium solitum* depositado sob o N° de acesso: DSM32093 e/ou o crescimento do fungo *Penicillium brevicompactum* depositado sob o N° de acesso: DSM32094 por pelo menos 60%, pelo menos 70% ou, pelo menos, 75%.

[0017] Deve ser entendido que a concentração de pelo menos 10⁷ UFC/g de cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção identificada no ensaio acima representa uma concentração fornecendo excelentes efeitos antifúngicos. Enquanto a invenção, por conseguinte, abrange as cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção em uma concentração de pelo menos 10⁷ UFC/g, como em uma concentração de 10⁷ UFC/g a 10¹¹ UFC/g, 10⁷ UFC/g a 10¹⁰ UFC/g e 10⁷ UFC/g a 10⁹ UFC/g, a invenção não está limitada a estas concentrações, como

bons efeitos antifúngicos também foram obtidos com uma concentração inferior.

[0018] De acordo com um aspecto, as bactérias da invenção são ainda caracterizadas em secretar quantidades baixas ou essencialmente nenhum composto volátil, que afeta as propriedades sensoriais do produto alimentar. Culturas iniciadoras comuns, como, por exemplo, misturas disponíveis comercialmente de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* são conhecidas por produzir compostos voláteis que contribuem significativamente para as propriedades sensoriais dos produtos fermentados. Acetaldeído, diacetila e acetoína, por exemplo, são compostos voláteis conhecidos, que afetam as propriedades sensoriais do produto alimentar. Em uma modalidade relacionada, as bactérias da presente invenção são caracterizadas pela redução da presença de acetaldeído como produzidas por outras bactérias na cultura iniciadora. Por exemplo, certas cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção podem ainda ser caracterizadas por ter a capacidade de reduzir a concentração de acetaldeído produzido por uma cultura iniciadora durante a fermentação em um produto lácteo fermentado por, pelo menos, 50%. A redução é determinada desse modo em comparação com um produto fermentado produzido sem as cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção. Ensaios diferentes são conhecidos na técnica para determinar a concentração de acetaldeído em um produto fermentado e podem ser utilizados para esse efeito de acordo com a presente invenção. A capacidade de reduzir a concentração de acetaldeído produzido por uma cultura iniciadora durante a fermentação em um produto lácteo fermentado por, pelo menos, 50%, é de preferência determinada em um ensaio compreendendo:

(1) preparar um produto lácteo fermentado por:

(a) inoculação de um leite com o *Lactobacillus fermentum* em uma concentração de pelo menos 10^7 UFC/g e com uma cultura

iniciadora,

- (b) fermentação até um pH de 4,6 ser atingido, e;
- (2) armazenar o produto lácteo fermentado a $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 14

dias;

- (3) adicionar 200 μL de 4N de H_2SO_4 para 1 g do produto lácteo fermentado e determinar a concentração de acetaldeído por cromatografia gasosa por headspace estático.

[0019] O acetaldeído é um componente de sabor produzido por bactérias produtoras de ácido láctico durante a fermentação. Enquanto o componente é desejável em certas aplicações, seria vantajoso reduzir ou evitar a presença de acetaldeído em outras aplicações. As bactérias *Lactobacillus fermentum* reduzindo a concentração de acetaldeído em produtos lácteos fermentados, por conseguinte, proporcionam vantagens em aplicações específicas, por exemplo, ao preparar iogurte suave ou adoçado. As cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção podem, por exemplo, reduzir a concentração de acetaldeído produzido por uma cultura iniciadora durante a fermentação em um produto lácteo fermentado por, pelo menos, 75%, pelo menos 95% ou, pelo menos, 98%.

[0020] Alternativa ou adicionalmente, as cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção podem ser caracterizadas pelo fato de que a bactéria secreta apenas diacetil na faixa de 0 a 5 ppm. A secreção de diacetil pode ser determinada por meio de diferentes ensaios conhecidos na técnica, mas é preferencialmente determinada em um ensaio compreendendo:

- (1) preparar um produto lácteo fermentado por:

- (a) inoculação de um leite com o *Lactobacillus fermentum* em uma concentração de pelo menos 10^7 UFC/g e com uma cultura iniciadora,

- (b) fermentação até um pH de 4,6 ser atingido, e;

(2) armazenar o produto lácteo fermentado a $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 14 dias;

(3) adicionar 200 μL de 4N de H_2SO_4 para 1 g do produto lácteo fermentado e determinar a concentração de diacetil por cromatografia gasosa por headspace estático.

[0021] As bactérias *Lactobacillus fermentum* secretando baixas concentrações de diacetil têm vantagens em métodos de produção de produtos alimentares com estas bactérias, do que outras cepas exercendo atividade antifúngica que produzem altas concentrações desses compostos voláteis, afetam o sabor do produto final e, por isso, não podem ser utilizadas para todas as aplicações. As cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção podem ser caracterizadas pelo fato de que a bactéria secreta apenas diacetil na faixa de 0 a 3 ppm ou 0 a 2 ppm.

[0022] As cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção podem ser caracterizadas por efeitos vantajosos adicionais. Por exemplo, as cepas podem ser caracterizadas pelo fato de que elas aumentam o pH (isto é, neutralizam a pós-acidificação) de um produto lácteo fermentado com *Lactobacillus fermentum* durante o armazenamento após fermentação em comparação com um produto lácteo fermentado com a mesma cultura iniciadora não contendo *Lactobacillus fermentum*. O aumento no pH é, no mínimo, por um valor de 0,1 e de preferência é determinado após guardar o produto fermentado durante 21 dias a 25°C . Como indicado acima, as bactérias antifúngicas da técnica anterior foram observadas para contribuir com a pós-acidificação. Os inventores surpreendentemente descobriram que as cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção não só não contribuem para a pós-acidificação, mas, na verdade, antagonizam a pós-acidificação aumentando o valor do pH. Como é mostrado nos Exemplos, a seguir, o efeito é particularmente notável nos processos de fermentação utilizando culturas

iniciadoras apresentando pós-acidificação significativa, incluindo um certo número de culturas iniciadoras disponíveis comercialmente e, em especial, quando utilizadas em conjunto com bactérias antifúngicas comerciais.

[0023] As cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção podem ser caracterizadas, por exemplo, na medida em que aumentam o pH de um produto lácteo fermentado com *Lactobacillus fermentum* durante o armazenamento após fermentação em comparação com um produto lácteo fermentado com a mesma cultura iniciadora não contendo *Lactobacillus fermentum*, onde o aumento em pH é, pelo menos, por um valor de 0,1 e é determinado após armazenar o produto fermentado durante 21 dias a 25°C, e onde a cultura iniciadora inclui LAB que são capazes de diminuir o pH de um produto lácteo durante a fermentação para um valor de pH 4,6 em 10 horas ou menos. Por exemplo, o ensaio pode ser baseado em misturas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Respectivas misturas são frequentemente utilizadas para a produção de iogurte e conhecidas por causar pós-acidificação.

[0024] Em uma modalidade relacionada um produto lácteo fermentado com *Lactobacillus fermentum* mantém um pH acima de 4,0, quando armazenado por pelo menos 14 dias a 25°C, onde o produto lácteo fermentado é obtido por um método composto por inoculação de um leite com o *Lactobacillus fermentum* em uma concentração de pelo menos 10^7 UFC/g e com uma cultura iniciadora, fermentando até um pH de 4,6 ser atingido, agitando o produto fermentado e refrigeração. Essas cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção, portanto, reduzem o efeito pós-acidificação observado em culturas bioprotetoras da técnica anterior e mesmo em culturas iniciadoras convencionais. Deve ser entendido que as características especificando que as cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção podem manter o pH acima de

4,0, quando armazenadas por pelo menos 14 dias a 25°C, simplesmente caracteriza o ensaio geralmente usado para determinar o efeito. Não é necessário ou exigido que as cepas de *Lactobacillus fermentum* da presente invenção, composições compreendendo as mesmas, incluindo alimentos ou ração, são de fato armazenadas sob essas condições. Novamente, em um aspecto, o ensaio pode ser realizado usando uma cultura iniciadora compreendendo LAB que são capazes de diminuir o pH de um produto lácteo durante a fermentação para um valor de pH 4,6 em 10 horas ou menos. Por exemplo, o ensaio pode ser baseado em misturas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

[0025] Bactérias da presente invenção podem ser vantajosamente derivadas de uma das seguintes cepas depositadas:

(a) a cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC12798 como depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig sob N^o. de acesso: 32084;

(b) a cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC12797 como depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig sob N^o. de acesso: 32085;

(c) a cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC14591 como depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig sob N^o. de acesso: 32086;

(d) a cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC14588 como

depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig sob N^o. de acesso: 32087;

(e) a cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC15844 como depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig sob N^o. de acesso: 32088;

(f) a cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC15865 como depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig sob N^o. de acesso: 32089;

(g) a cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC15847 como depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig sob N^o. de acesso: 32090;

(h) a cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC15848 como depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig sob N^o. de acesso: 32091;

(i) a cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC15926 como depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig sob N^o. de acesso: 32096;

(j) a cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC2008 como

depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig sob N^o. de acesso: 22584;

(k) uma cepa mutante obtida a partir de uma das bactérias depositadas de acordo com (a) a (j), na qual a mutante tem a capacidade de inibir o crescimento do fungo *Penicillium solitum* depositado em DSMZ sob o N^o de acesso: 32093 ou o crescimento do fungo *Penicillium brevicompactum* depositado em DSMZ sob o N^o de acesso: 32094 por, pelo menos, 50% em um ensaio compreendendo:

(1) preparar um produto lácteo fermentado por:

(a) inoculação do leite com o *Lactobacillus fermentum* em uma concentração de pelo menos 10⁷ UFC/g e com uma cultura iniciadora,

(b) fermentação até um pH de 4,6 ser atingido, e

(c) solidificação do leite fermentado por adição de ágar;

(2) gerar pelo menos uma mancha de *P. solitum* ou *P. brevicompactum* sobre o ágar do leite fermentado solidificado com uma concentração de 500 esporos/mancha e incubando o mesmo por 7 dias a 25°C;

(3) determinar a porcentagem de inibição por determinação do maior diâmetro da colônia formada pelo crescimento de *P. solitum* ou *P. brevicompactum* e expressando o diâmetro como porcentagem do maior diâmetro formado sob as mesmas condições, mas na ausência da cepa *Lactobacillus fermentum*.

[0026] No contexto da presente aplicação, o termo "bactérias formadoras de ácido láctico" ou "LAB" é usado para se referir às bactérias de qualidade alimentar produtoras de ácido láctico como principal produto final metabólico de fermentação de carboidratos. Estas bactérias

são relacionadas por suas características comuns metabólicas e fisiológicas e são geralmente Gram-positivas, de baixo teor de GC, tolerantes a ácido, não esporulante, sem respiração, bacilos em forma de bastão ou cocos. Durante a fase de fermentação, o consumo de lactose por estas bactérias provoca a formação de ácido láctico, diminuindo o pH e levando à formação de um coágulo de proteínas. Estas bactérias são, assim, responsáveis pela acidificação do leite e pela textura do produto lácteo. Como usado aqui, o termo "bactérias formadoras de ácido láctico" inclui, mas não está limitado a, bactérias pertencentes ao gênero de *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp., como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve* e *Leuconostoc* spp.

[0027] Dependendo da temperatura ideal para a propagação, as LAB são caracterizadas como LAB mesofílicas ou termofílicas. O termo "mesofílica" refere-se aos microrganismos que prosperam melhor em temperaturas moderadas. O termo "fermentação mesofílica" aqui refere-se à fermentação a uma temperatura entre 22°C e 35°C. O termo "produto lácteo fermentado mesofílico" refere-se a produtos lácteos fermentados preparados por fermentação mesofílica de uma cultura iniciadora e incluir tais produtos lácteos fermentados, como leitelho, coallhada, leite cultivado, smetana, creme azedo e queijo fresco, como quark, tvarog e cream cheese. As bactérias mesofílicas mais úteis industrialmente incluem *Lactococcus* spp. e *Leuconostoc* spp.

[0028] O termo "termofílica" refere-se aos microrganismos que prosperam melhor em temperaturas altas. O termo "fermentação termofílica" aqui refere-se a métodos de fermentação realizados a uma tem-

peratura entre cerca de 35°C e 45°C. O termo "produto lácteo fermentado termofílico" refere-se a produtos lácteos fermentados preparados pela fermentação termofílica utilizando uma cultura iniciadora termofílica e inclui tais produtos lácteos fermentados como iogurte natural, iogurte batido, iogurte grego e iogurte para beber. As bactérias termofílicas mais úteis industrialmente incluem *Streptococcus* spp. e *Lactobacillus* spp.

[0029] Como será descrito a seguir, a presente invenção abrange métodos usando fermentação mesofílica e termofílica.

[0030] O termo "inibir" em relação aos fungos, leveduras e bolores, refere-se a uma diminuição no crescimento e esporulação ou uma redução no número ou na concentração de fungos, leveduras e bolores, por exemplo, em produtos alimentares e/ou na superfície de produtos alimentares compreendendo as bactérias da presente invenção em relação aos produtos alimentares que não compreendem tais bactérias. O grau de inibição fornecido pela bactéria *Lactobacillus fermentum* da presente invenção é de preferência determinado pelo crescimento em ágar de leite fermentado solidificado na presença e ausência de bactérias *Lactobacillus fermentum*.

[0031] Neste contexto, o termo "mutante" deve ser entendido como uma cepa derivada de uma cepa da invenção por meio, por exemplo, de engenharia genética, radiação e/ou tratamento químico. É preferível que o mutante seja um mutante funcionalmente equivalente, por exemplo, um mutante que tem substancialmente a mesma, ou melhor, propriedade, em especial em relação às propriedades antifúngicas, como a cepa depositada. Tal mutante é uma parte da presente invenção. Especialmente, o termo "mutante" refere-se a uma cepa obtida submetendo uma cepa da invenção a qualquer tratamento de mutagenização convencionalmente utilizado, incluindo o tratamento com um mutagênico químico como metanosulfonato de etilo (EMS) ou N-metil-N'-nitro-N-ni-

troguanidina (NTG), luz UV ou um mutante que ocorre espontaneamente. Um mutante pode ter sido submetido a vários tratamentos de mutagenização (um único tratamento deve ser entendido como uma etapa de mutagenização seguida de uma etapa de seleção/triagem), mas neste momento é preferível que não mais que 20, ou não mais do que 10, ou não mais do que 5 tratamentos (ou etapas de seleção/triagem) sejam realizados. Em um mutante atualmente preferido, menos de 5% ou menos de 1% ou mesmo menos de 0,1% dos nucleotídeos no genoma bacteriano tem sido trocado com outro nucleotídeo, ou excluído, em comparação com a cepa mãe.

[0032] O uso dos termos "um/uma" e "o/a" e referências similares utilizadas no contexto da presente invenção (especialmente no contexto das reivindicações a seguir) são para ser interpretados de modo a abranger tanto o singular como o plural, salvo indicação em contrário no presente documento ou claramente contrariado pelo contexto.

[0033] A presente invenção fornece ainda composições compreendendo pelo menos uma bactéria da espécie *Lactobacillus fermentum* tendo a capacidade de inibir o crescimento do fungo *Penicillium solitum* CHCC16948 depositado em DSMZ sob o N° de acesso: 32093 ou o crescimento do fungo *Penicillium brevicompactum* CHCC16935 depositado em DSMZ sob o N° de acesso: 32094 em um ágar de leite fermentado solidificado por pelo menos 50% no ensaio como descrito acima.

[0034] As composições respectivas podem incluir várias outras bactérias incluindo LABs. A composição da presente invenção é caracterizada, portanto, pelo fato de que a composição inclui ainda pelo menos uma outra bactéria selecionada de um ou mais dos seguintes gêneros e espécies *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Lactococcus* spp., tais como *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus lactis*, *Bifidobacterium ani-*

malis, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium breve* e *Leuconostoc* spp.

[0035] Em uma modalidade particularmente preferencial, as composições da presente invenção compreendem, pelo menos, uma bactéria da espécie *Lactobacillus fermentum* com atividade antifúngica, conforme descrito acima, e uma ou mais segunda bactéria com atividade antifúngica. Em uma modalidade, várias diferentes cepas de bactérias *Lactobacillus fermentum* com atividade antifúngica da presente invenção são combinadas. Alternativamente, estas bactérias podem, por exemplo, ser selecionadas a partir de:

(a) bactéria *Lactobacillus rhamnosus* da cepa CHCC15860 como depositado com a Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas de Células (DSMZ) sob N° de acesso DSM32092;

(b) bactéria *Lactobacillus rhamnosus* da cepa CHCC5366 como depositado com a Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas de Células (DSMZ) sob N° de acesso DSM23035;

(c) bactéria *Lactobacillus rhamnosus* da cepa CHCC12697 como depositado com a Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas de Células (DSMZ) sob N° de acesso DSM24616;

(d) bactéria *Lactobacillus paracasei* da cepa CHCC12777 como depositado com a Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas de Células (DSMZ) sob N° de acesso DSM24651;

(e) bactéria *Lactobacillus paracasei* da cepa CHCC14676 como depositado com a Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas de Células (DSMZ) sob N° de acesso DSM25612.

[0036] Os presentes inventores encontraram efeitos antifúngicos aditivos para estas cepas e um surpreendente efeito antifúngico sinérgico causado por uma combinação de *Lb. rhamnosus* CHCC15860 e *Lb. fermentum* CHCC14591 em comparação com o efeito inibitório de

cada cepa utilizada sozinha.

[0037] As composições da presente invenção podem, além disso, incluir componentes mais numerosos, incluindo um ou mais compostos crioprotetores, bem como compostos aromatizantes.

[0038] LAB são mais comumente adicionadas na forma de uma cultura iniciadora ao leite. O termo "iniciadora" ou "cultura iniciadora", como utilizado neste contexto, refere-se a uma cultura de um ou mais microrganismos de grau alimentar, em particular bactérias formadoras de ácido láctico, que são responsáveis pela acidificação da base do leite. Culturas iniciadoras podem ser frescas, mas são mais frequentemente congeladas ou liofilizadas. Estes produtos também são conhecidos como culturas de inoculação direta DVS (Direct Vat Set) e são produzidas para inoculação direta de um vaso ou cuba de fermentação para a produção de um produto lácteo, como um produto lácteo fermentado ou um queijo. Respective culturas iniciadoras estão comercialmente disponíveis a partir de várias fontes e incluem F-DVS YoFlex Mild 2.0, F-DVS YF-L901, FD-DVS YF-812 e F-DVS CH-1, quatro culturas comercialmente disponíveis de Chr. Hansen que contêm misturas de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

[0039] Em um aspecto, a presente invenção fornece portanto composições sob a forma de uma cultura iniciadora sólida congelada ou liofilizada composta por bactérias formadoras de ácido láctico em uma concentração de pelo menos 10^9 unidades formadoras de colônias por grama de material congelado ou em uma concentração de pelo menos 10^{10} unidades formadoras de colônias por grama de material congelado ou em uma concentração de pelo menos 10^{11} unidades formadoras de colônias por grama de material congelado, cujas composições incluem uma bactéria da espécie *Lactobacillus fermentum* com atividade antifúngica como descrito acima.

[0040] A presente invenção fornece ainda bactérias *Lactobacillus*

fermentum e composições compreendendo as mesmas que são caracterizadas por mais de uma das características acima e composições compreendendo as mesmas. Por exemplo, a presente invenção fornece uma bactéria da espécie *Lactobacillus fermentum* tendo a capacidade de inibir o crescimento do fungo *Penicillium solitum* depositado sob o N^o de acesso: DSM32093 ou o crescimento do fungo *Penicillium brevicompactum* depositado sob o N^o de acesso: DSM32094 por, pelo menos, 50% determinado em um ensaio compreendendo:

(1) preparar um produto lácteo fermentado por:

(a) inoculação de um leite com o *Lactobacillus fermentum* em uma concentração de pelo menos 10^7 UFC/g e com uma cultura iniciadora,

(b) fermentação até um pH de 4,6 ser atingido, e

(c) solidificação do leite fermentado por adição de ágar;

(2) gerar pelo menos uma mancha de *P. solitum* ou *P. brevicompactum* sobre o ágar do leite fermentado solidificado com uma concentração de 500 esporos/mancha e incubando o mesmo por 7 dias a 25°C;

(3) determinar a porcentagem de inibição por determinação do maior diâmetro da colônia formada pelo crescimento de *P. solitum* ou *P. brevicompactum* e expressando o diâmetro como porcentagem do maior diâmetro formado sob as mesmas condições, mas na ausência da cepa *Lactobacillus fermentum*;

e ainda mais caracterizado em que a bactéria da espécie *Lactobacillus fermentum* secreta diacetil em um intervalo de 0 a 5 ppm, onde a concentração de diacetil é determinada em um ensaio compreendendo:

(4) preparar um produto lácteo fermentado por:

(a) inoculação de um leite com o *Lactobacillus fermentum* em uma concentração de pelo menos 10^7 UFC/g e com uma cultura

iniciadora,

- (b) fermentação até um pH de 4,6 ser atingido, e;
- (5) armazenar o produto lácteo fermentado a $7\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 14

dias;

(6) adicionar 200 μL de 4N de H_2SO_4 para 1 g do produto lácteo fermentado e determinar a concentração de diacetil por cromatografia gasosa por headspace estático.

[0041] Essas bactérias podem ainda ser caracterizadas por ter a capacidade de reduzir a concentração de acetaldeído produzido por uma cultura iniciadora durante a fermentação em um produto lácteo fermentado por, pelo menos, 50%.

[0042] Alternativa ou adicionalmente, as bactérias da espécie *Lactobacillus fermentum* podem ser caracterizadas pelo fato de que elas aumentam o pH de um produto lácteo fermentado com *Lactobacillus fermentum* durante o armazenamento após fermentação em comparação com um produto lácteo fermentado com a mesma cultura iniciadora não contendo *Lactobacillus fermentum*.

[0043] Em uma modalidade separada, a invenção fornece ainda uma bactéria *Lactobacillus fermentum* tendo a capacidade de inibir o crescimento do fungo *Penicillium solitum* depositado sob o N^o de acesso: DSM32093 ou o crescimento do fungo *Penicillium brevicompactum* depositado sob o N^o de acesso: DSM32094 por, pelo menos, 50% determinado em um ensaio compreendendo:

(1) preparar um produto lácteo fermentado por:

(a) inoculação de um leite com o *Lactobacillus fermentum* em uma concentração de pelo menos 10^7 UFC/g e com uma cultura iniciadora,

- (b) fermentação até um pH de 4,6 ser atingido, e
- (c) solidificação do leite fermentado por adição de ágar;

(2) gerar pelo menos uma mancha de *P. solitum* ou *P. brevicompactum* sobre o ágar do leite fermentado solidificado com uma concentração de 500 esporos/mancha e incubando o mesmo por 7 dias a 25°C;

(3) determinar a porcentagem de inibição por determinação do maior diâmetro da colônia formada pelo crescimento de *P. solitum* ou *P. brevicompactum* e expressando o diâmetro como porcentagem do maior diâmetro formado sob as mesmas condições, mas na ausência da cepa *Lactobacillus fermentum*;

e ainda mais caracterizado em que a bactéria da espécie *Lactobacillus fermentum* aumenta o pH de um produto lácteo fermentado compreendendo *Lactobacillus fermentum* durante o armazenamento após fermentação em comparação com um produto lácteo fermentado com a mesma cultura iniciadora não contendo *Lactobacillus fermentum*, onde o aumento no pH é, pelo menos, por um valor de 0,1, e onde o aumento em pH é determinado após armazenar o produto fermentado durante 21 dias a 25°C. Mais uma vez, em uma modalidade, essas bactérias podem ainda ter a capacidade de reduzir a concentração de acetaldeído produzido por uma cultura iniciadora durante a fermentação em um produto lácteo fermentado por, pelo menos, 50%.

[0044] Em mais uma modalidade, a presente invenção fornece métodos de produção de um produto lácteo fermentado que inclui a adição da bactéria *Lactobacillus fermentum* com atividade antifúngica, conforme descrito acima, ou a composição compreendendo o mesmo para o leite ou um produto lácteo e fermentando a mistura a uma temperatura entre cerca de 22°C e 43°C, até um pH inferior a 4,6 ser atingido.

[0045] No contexto da presente aplicação, o termo "leite" é amplamente utilizado na sua acepção comum para se referir aos líquidos produzidos pelas glândulas mamárias de animais ou plantas. De acordo com a presente invenção, o leite pode ter sido processado e o termo

"leite" inclui leite integral, leite desnatado, leite livre de gordura, leite integral com baixo teor de gordura, leite cheio de gordura, leite com redução de lactose ou leite concentrado. Leite sem gordura é um produto lácteo semidesnatado ou desnatado. Leite com baixo teor de gordura é normalmente definido como o leite que contém de cerca de 1% a cerca de 2% de gordura. Leite cheio de gordura muitas vezes contém 2% de gordura ou mais. O termo "leite" destina-se a abranger leites de mamíferos diferentes e fontes vegetais. Fontes de leite de mamíferos incluem, mas não estão limitados ao leite de vaca, ovelha, cabra, búfalo, camelo, lhama, égua e veados. Fontes vegetais de leite incluem, mas não estão limitados a leite extraído da soja, ervilha, amendoim, arroz, aveia, cevada, quinoa, amêndoa, caju, coco, avelã, cânhamo, girassol e gergelim. Nos métodos e produtos da presente invenção, leite de vaca é, de preferência, mais utilizado como material de partida para a fermentação.

[0046] O termo "leite" inclui também produtos lácteos de teor reduzido de gordura e/ou lactose. Respective produtos podem ser preparados utilizando métodos bem conhecidos na técnica e estão comercialmente disponíveis (por exemplo, a partir de Select Milk Producers Inc., Texas, USA). Leite reduzido em lactose pode ser produzido de acordo com qualquer método conhecido na técnica, incluindo hidrolisar a lactose pela enzima lactase em glicose e galactose, ou por nanofiltração, eletrodialise, cromatografia de troca iônica e centrifugação.

[0047] O termo "produto lácteo" ou "base de leite" é amplamente utilizado no presente pedido para se referir a uma composição à base de leite ou componentes de leite que podem ser utilizados como um meio para o crescimento e fermentação de LAB. O produto ou base de leite compreende componentes derivados do leite e qualquer outro componente que pode ser usado com a finalidade de crescer ou fermentar as LAB.

[0048] A etapa de fermentação do processo para a fabricação de

produtos lácteos fermentados compreende a adição de LAB ao leite. Os processos de fermentação utilizados na produção de produtos lácteos são bem conhecidos e uma pessoa de habilidades comum pode selecionar as condições de processo de fermentação, incluindo temperatura, oxigênio, quantidade e características do(s) microrganismo(s) e tempo de fermentação.

[0049] Antes da fermentação, o substrato de leite pode ser homogeneizado e pasteurizado de acordo com os métodos conhecidos na técnica. "Homogeneização" como aqui utilizado significa mistura intensiva para obter uma suspensão ou emulsão solúvel. Se a homogeneização for realizada antes da fermentação, pode ser executada de modo a quebrar a gordura do leite em tamanhos menores, para que não mais se separe do leite. Isso pode ser feito ao forçar o leite a alta pressão através de pequenos orifícios. "Pasteurização", como utilizado aqui significa o tratamento do substrato do leite para reduzir ou eliminar a presença de organismos vivos, como, por exemplo, microrganismos. De preferência, a pasteurização é alcançada através da manutenção de uma temperatura especificada por um período de tempo especificado. A temperatura especificada é geralmente alcançada pelo aquecimento. A temperatura e duração podem ser selecionadas de forma a matar ou inativar determinadas bactérias, como as bactérias nocivas. Uma etapa de refrigeração rápida pode seguir.

[0050] Em um método particularmente vantajoso da presente invenção a bactéria *Lactobacillus fermentum* com efeitos antifúngicos como descrito acima ou a composição compreendendo a mesma é adicionada ao leite ou a um produto lácteo e a mistura é fermentada, de tal forma que

(a) a concentração da bactéria *Lactobacillus fermentum* com efeitos antifúngicos é pelo menos 1×10^6 ufc/g ou pelo menos 1×10^7 ufc/g no final da fermentação do produto lácteo fermentado; e/ou

(b) de tal forma que a concentração das bactérias *Lactobacillus fermentum* com efeitos antifúngicos é pelo menos 1×10^5 ufc/cm² na superfície do produto lácteo fermentado.

[0051] Esta maneira de proceder tem a vantagem de que o efeito antifúngico da bactéria *Lactobacillus fermentum* pode ser totalmente utilizado.

[0052] Uma maneira de alcançar a concentração é usando um método de produção de um produto lácteo fermentado, onde os parâmetros de fermentação são mantidos tal que a concentração das bactérias *Lactobacillus fermentum* descrita acima aumenta durante a fermentação. Usando culturas iniciadoras convencionais e as condições de fermentação (como descrito nos exemplos) geralmente vai aumentar a concentração de bactérias *Lactobacillus fermentum* descritas acima durante a fermentação por pelo menos 0,5 log. Alternativamente, os parâmetros de fermentação são mantidos tal que a concentração das bactérias *Lactobacillus fermentum* descrita acima não diminui significativamente, por exemplo, não diminui por mais de 30%, não mais do que 25%, ou não mais de 20% durante a fermentação e armazenamento.

[0053] A presente invenção também fornece o fermentado obtido por fermentação de um produto lácteo com as bactérias *Lactobacillus fermentum* da presente invenção. O termo fermentado é usado para se referir a um produto de fermentação. Um respectivo fermentado pode ser um líquido obtido a partir do processo de fermentação utilizando as bactérias *Lactobacillus fermentum* da presente invenção. O líquido pode conter bactérias, mas não precisa conter as mesmas. De preferência o líquido contém os metabólitos antifúngicos produzidos pelas bactérias *Lactobacillus fermentum* da presente invenção. Os fermentados podem ser usados para produzir alimentos, ração ou produtos farmacêuticos. Por exemplo, o fermentado pode ser pulverizado em alimentos ou produtos alimentícios para alcançar um efeito antifúngico.

[0054] A invenção fornece métodos adicionais para produzir um alimento, ração ou produto farmacêutico compreendendo um método para produzir um produto lácteo fermentado como descrito acima e o alimento, ração ou produto farmacêutico obtido por este método.

[0055] A fermentação é realizada para produzir produtos alimentares, produtos para animais ou produtos farmacêuticos. Os termos "produto lácteo fermentado", "alimento" ou "ração" se referem a produtos obtidos por métodos de fermentação da presente invenção e incluem queijo, iogurte, iogurte de fruta, bebida de iogurte, iogurte grego (Labneh), quark, queijo fresco e cream cheese. O termo alimento engloba ainda outros alimentos fermentados, incluindo carnes, como embutidos fermentados e produtos de peixe fermentado.

[0056] O termo "queijo" é entendido para abranger qualquer queijo, incluindo queijo duro, semiduro e suaves, como queijos dos seguintes tipos: Cottage, queijo Feta, Cheddar, parmesão, mussarela, Emmental, Danbo, Gouda, Edam, tipo Feta, queijos azuis, queijos em salmoura, queijos Camembert e Brie. O especialista na técnica sabe como converter o coágulo em queijo, os métodos podem ser encontrados na literatura, ver, por exemplo, Kosikowski, F. V., and V. V. Mistry, "Cheese and Fermented Milk Foods", 1997, 3ª Ed. F. V. Kosikowski, L. L. C. Westport, CT. Como usado aqui, um queijo que tem uma concentração de NaCl inferior a 1,7% (p/p) é referido como um "queijo com baixo teor de sal".

[0057] No contexto da presente aplicação, o termo "iogurte" refere-se a produtos compreendendo *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e opcionalmente outros microrganismos, como *Lactobacillus delbrueckii subsp. lactis*, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus paracasei*, ou qualquer micro-organismo derivado deles. As cepas de ácido láctico diferentes de *Streptococcus thermophilus* e *Lac-*

tobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus estão incluídas para dar o produto acabado várias propriedades, como a propriedade de promover o equilíbrio da flora. Como usado aqui, o termo "iogurte" engloba iogurte natural, iogurte batido, iogurte grego, iogurte para beber, Petit Suisse, iogurte tratado pelo calor, iogurte grego, caracterizado por um elevado nível de proteína e produtos similares a iogurte.

[0058] Em particular, o termo "iogurte" inclui, mas não está limitado a, iogurte, conforme definido de acordo com a regulamentação francesa e europeia, por exemplo, produtos lácteos coagulados obtidos por fermentação de ácido láctico por meio de bactérias formadoras de ácido láctico termofílicas específicas (ou seja, *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) que são cultivadas simultaneamente e são encontradas para ser viver no produto final em uma quantidade de pelo menos 10 milhões de UFC (unidade formadora de colônia)/g. Os iogurtes podem opcionalmente conter matérias-primas lácteas adicionadas (por exemplo, creme) ou outros ingredientes como açúcar ou edulcorantes, um ou mais agente(s) aromatizante(s), frutas, cereais, ou substâncias nutritivas, especialmente as vitaminas, minerais e fibras, bem como estabilizantes e espessantes. Opcionalmente, o iogurte atende as especificações de leites fermentados e iogurtes de AFNOR NF 04-600 padrão e/ou Codex StanA-Ila-1975 padrão. A fim de satisfazer AFNOR NF 04-600 padrão, o produto não deve ter sido aquecido após a fermentação e as matérias-primas lácteas devem representar um mínimo de 70% (m/m) do produto acabado.

[0059] Em uma modalidade adicional a presente invenção fornece alimentos, ração ou produtos farmacêuticos, compreendendo uma ou mais bactérias da espécie *Lactobacillus fermentum* com efeitos antifúngicos como descrito acima e um ou mais dos seguintes:

- (a) pelo menos uma outra bactéria selecionada de um ou

mais dos seguintes gêneros *Lactococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Pseudoleuconostoc* spp., *Pediococcus* spp., *Brevibacterium* spp. e *Enterococcus* spp.;

(b) bactéria *Lactobacillus rhamnosus* da cepa CHCC15860 como depositado com a Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas de Células (DSMZ) sob N° de acesso DSM32092;

(c) bactéria *Lactobacillus rhamnosus* da cepa CHCC5366 como depositado com a Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas de Células (DSMZ) sob N° de acesso DSM23035;

(d) bactéria *Lactobacillus rhamnosus* da cepa CHCC12697 como depositado com a Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas de Células (DSMZ) sob N° de acesso DSM24616;

(e) bactéria *Lactobacillus paracasei* da cepa CHCC12777 como depositado com a Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas de Células (DSMZ) sob N° de acesso DSM24651; e

(f) bactéria *Lactobacillus paracasei* da cepa CHCC14676 como depositado com a Coleção Alemã de Micro-organismos e Culturas de Células (DSMZ) sob N° de acesso DSM25612.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0060] Figura 1: Crescimento de bolores em placas preparadas a partir de leite fermentado, com uma cultura iniciadora sozinha (referência, primeira coluna), junto com FreshQ[®]4 (segunda coluna), junto com Holdbac[®] YM-C Plus (terceira coluna), ou junto com *Lb. fermentum* CHCC14591 (quarta coluna). As placas foram incubadas à 7±1°C por 19 dias (linha superior) e 27 dias (linha inferior). Os contaminantes alvo foram adicionados na concentração de 500 esporos/mancha: (A) *P. carneum*, (B) *P. paneum* e (C) *P. roqueforti*.

[0061] Figura 2: Crescimento de bolores em placas preparadas a partir de leite fermentado, com uma cultura iniciadora sozinha (referência, primeira coluna), junto com FreshQ[®]4 (segunda coluna), junto com

Holdbac® YM-C Plus (terceira coluna), ou junto com *Lb. fermentum* CHCC14591 (quarta coluna). As placas foram incubadas à $25\pm 1^\circ\text{C}$ por 6 dias (linha superior) e 11 dias (linha inferior). Os contaminantes alvo foram adicionados na concentração de 500 esporos/mancha: (A) *P. carneum*, (B) *P. paneum* e (C) *P. roqueforti*.

[0062] Figura 3: Crescimento de bolores em placas preparadas a partir de leite fermentado, com uma cultura iniciadora sozinha (referência, primeira coluna), junto com FreshQ®4 (segunda coluna), junto com Holdbac® YM-C Plus (terceira coluna), ou junto com *Lb. fermentum* CHCC14591 (quarta coluna). As placas foram incubadas à $7\pm 1^\circ\text{C}$ por 19 dias (linha superior) e 27 dias (linha inferior). Os contaminantes alvo foram adicionados na concentração de 500 esporos/mancha: (A) *P. brevicompactum*, (B) *P. crustosum* e (C) *P. solitum*.

[0063] Figura 4: Crescimento de bolores em placas preparadas a partir de leite fermentado, com uma cultura iniciadora sozinha (referência, primeira coluna), junto com FreshQ®4 (segunda coluna), junto com Holdbac® YM-C Plus (terceira coluna), ou junto com *Lb. fermentum* CHCC14591 (quarta coluna). As placas foram incubadas à $25\pm 1^\circ\text{C}$ por 6 dias (linha superior) e 11 dias (linha inferior). Os contaminantes alvo foram adicionados na concentração de 500 esporos/mancha: (A) *P. brevicompactum* (DSM32093), (B) *P. crustosum* e (C) *P. solitum* (DSM32093).

[0064] Figura 5: Crescimento de leveduras em placas preparadas a partir de leite fermentado, com uma cultura iniciadora sozinha (referência, primeira coluna), junto com FreshQ®4 (segunda coluna), junto com Holdbac® YM-C Plus (terceira coluna), ou junto com *Lb. fermentum* CHCC14591 (quarta coluna). As placas foram incubadas à $7\pm 1^\circ\text{C}$ por 11 dias (linha superior) e $25\pm 1^\circ\text{C}$ por 5 dias (linha inferior). Os contaminantes alvo foram adicionados em concentrações de 1×10^3 ufc/mancha (linha superior), 1×10^2 ufc/mancha (linha média) e 1×10^1 ufc/mancha

(linha inferior): (A) *Torulaspota delbrueckii*, (B) *Cryptococcus hansenii*, (C) *Debaryomyces hansenii* e (D) *Yarrowia lipolytica*.

[0065] Figura 6: Níveis de diacetil após armazenamento a $7\pm 1^\circ\text{C}$ por 14 dias em produtos lácteos fermentados com cultura iniciadora sozinha (referência), ou culturas iniciadoras em combinação com FreshQ[®]4, Holdbac[®] YM-C Plus ou *Lb. fermentum* CHCC14591. LOD: Limite de detecção. LOQ: Limite de quantificação.

[0066] Figura 7: Crescimento de bolores em placas preparadas a partir de leite fermentado, com uma cultura iniciadora sozinha (referência, primeira coluna), junto com *Lb. ramosus* CHCC15860 (segunda coluna), junto com *Lb. fermentum* CHCC14591 (terceira coluna), ou junto com uma combinação de *Lb. ramosus* CHCC15860 e *Lb. fermentum* CHCC14591 (quarta coluna). As placas foram incubadas a $25\pm 1^\circ\text{C}$ por 5 dias. Os contaminantes alvo foram adicionados na concentração de 500 esporos/mancha: (A) *P. carneum*, (B) *P. paneum* e (C) *P. roqueforti*.

[0067] Figura 8: Crescimento de bolores em placas preparadas a partir de leite fermentado com (1) uma cultura iniciadora sozinha, junto com (2) *Lb. fermentum* CHCC12798, (3) *Lb. fermentum* CHCC12797, (4) *Lb. fermentum* CHCC14591, (5) *Lb. fermentum* CHCC14588, (6) *Lb. fermentum* CHCC15844, (7) *Lb. fermentum* CHCC15865, (8) *Lb. fermentum* CHCC15847, (9) *Lb. fermentum* CHCC15848, (10) *Lb. fermentum* CHCC15926 e (11) *Lb. fermentum* CHCC2008. As placas foram incubadas a $25\pm 1^\circ\text{C}$ por 5 dias (coluna à esquerda das fotos) ou 7 dias (coluna à direita das fotos). Os contaminantes alvo foram adicionados na concentração de 500 esporos/mancha: (A) *P. brevicompactum* (DSM32094), (B) *P. crustosum* e (C) *P. solitum* (DSM32093).

[0068] Figura 9: Níveis de diacetil após armazenamento a $7\pm 1^\circ\text{C}$ por 14 dias em produtos lácteos fermentados com cultura iniciadora sozinha (referência), ou culturas iniciadoras em combinação com

FreshQ[®]4, Holdbac[®] YM-C Plus ou cepas de *Lb. fermentum*. LOD: Limite de detecção. LOQ: Limite de quantificação.

[0069] Figura 10: Desenvolvimento de pH em produtos lácteos fermentados ao longo do tempo, quando armazenados a (A) 7±1°C e (B) 25±1°C por 28 dias. Os produtos são fermentados com cultura iniciadora apenas, referência ou cultura iniciadora em combinação com FreshQ[®]4, Holdbac[®] YM-C Plus ou cepas de *Lb. Fermentum*.

[0070] Figura 11: Desenvolvimento de pH em produtos lácteos fermentados ao longo do tempo, quando armazenados a (A) 7±1°C ou (B) 25±1°C por 21 dias. Os produtos são fermentados com cultura iniciadora apenas (referência, Δ) ou cultura iniciadora em combinação com FreshQ[®]4 (◇), Holdbac[®] YM-C Plus (o) ou *Lb. fermentum* CHCC14591 (□).

[0071] Figura 12: Níveis de acetaldeído após armazenamento a 7±1°C por 14 dias em produtos lácteos fermentados com cultura iniciadora sozinha (referência), ou culturas iniciadoras em combinação com cepas de *Lb. fermentum*. LOD: Limite de detecção. LOQ: Limite de quantificação.

[0072] Figura 13: Níveis de acetaldeído após armazenamento a 7±1°C por 14 dias em produtos lácteos fermentados com cultura iniciadora sozinha (referência), ou culturas iniciadoras em combinação com *Lb. Fermentum* CHCC14591. LOD: Limite de detecção. LOQ: Limite de quantificação.

[0073] Figura 14: Curvas de acidificação de quatro culturas iniciadoras comerciais, FD-DVS 6290-L812, F-DVS 6290-L901, F-DVS YoFlex 2.0 leve e F-DVS CH-1, cultivadas no leite (1% de gordura e 4,5% de proteína) a 43°C.

[0074] Figura 15: Curvas de pós-acidificação de iogurtes fermentados com uma de quatro culturas iniciadoras comerciais, FD-DVS YF-L812, F-DVS YF-L901, F-DVS YoFlex Mild 2.0 e F-DVS CH-1 após o

armazenamento a 6°C por até 43 dias.

[0075] Figura 16: Crescimento de bolores em placas preparadas a partir de leite fermentado com (1) uma cultura iniciadora sozinha, FD-DVS YF-L812, junto com (2) *Lb. fermentum* CHCC12798, (3) *Lb. fermentum* CHCC12797, (4) *Lb. fermentum* CHCC14591, (5) *Lb. fermentum* CHCC14588, (6) *Lb. fermentum* CHCC15844, (7) *Lb. fermentum* CHCC15865, (8) *Lb. fermentum* CHCC15847, (9) *Lb. fermentum* CHCC15926 e (10) *Lb. fermentum* CHCC2008. As placas foram incubadas a 25±1°C por 4 dias (coluna à esquerda das fotos) ou 8 dias (coluna à direita das fotos). O contaminante alvo, *P. brevicompactum* (DSM32094), foi adicionado na concentração de 500 esporos/mancha.

[0076] Figura 17: Crescimento de bolores em placas preparadas a partir de leite fermentado com (1) uma cultura iniciadora sozinha, F-DVS CH-1, junto com (2) *Lb. fermentum* CHCC12798, (3) *Lb. fermentum* CHCC12797, (4) *Lb. fermentum* CHCC14591, (5) *Lb. fermentum* CHCC14588, (6) *Lb. fermentum* CHCC15844, (7) *Lb. fermentum* CHCC15865, (8) *Lb. fermentum* CHCC15847, (9) *Lb. fermentum* CHCC15926 e (10) *Lb. fermentum* CHCC2008. As placas foram incubadas a 25±1°C por 4 dias (coluna à esquerda das fotos) ou 8 dias (coluna à direita das fotos). O contaminante alvo, *P. brevicompactum* (DSM32094), foi adicionado na concentração de 500 esporos/mancha.

[0077] Figura 18: Crescimento de bolores em placas preparadas a partir de leite fermentado com (1) uma cultura iniciadora sozinha, FD-DVS YF-L812, junto com (2) *Lb. fermentum* CHCC12798, (3) *Lb. fermentum* CHCC12797, (4) *Lb. fermentum* CHCC14591, (5) *Lb. fermentum* CHCC14588, (6) *Lb. fermentum* CHCC15844, (7) *Lb. fermentum* CHCC15865, (8) *Lb. fermentum* CHCC15847, (9) *Lb. fermentum* CHCC15926 e (10) *Lb. fermentum* CHCC2008. As placas foram incubadas a 25±1°C por 4 dias (coluna à esquerda das fotos) ou 8 dias (coluna à direita das fotos). O contaminante alvo, *P. solitum*

(DSM32093), foi adicionado na concentração de 500 esporos/mancha.

[0078] Figura 19: Crescimento de bolores em placas preparadas a partir de leite fermentado com (1) uma cultura iniciadora sozinha, F-DVS CH-1, junto com (2) *Lb. fermentum* CHCC12798, (3) *Lb. fermentum* CHCC12797, (4) *Lb. fermentum* CHCC14591, (5) *Lb. fermentum* CHCC14588, (6) *Lb. fermentum* CHCC15844, (7) *Lb. fermentum* CHCC15865, (8) *Lb. fermentum* CHCC15847, (9) *Lb. fermentum* CHCC15926 e (10) *Lb. fermentum* CHCC2008. As placas foram incubadas a $25\pm 1^\circ\text{C}$ por 4 dias (coluna à esquerda das fotos) ou 8 dias (coluna à direita das fotos). O contaminante alvo, *P. solitum* (DSM32093), foi adicionado na concentração de 500 esporos/mancha.

[0079] Figura 20: Níveis de diacetil após armazenamento a $7\pm 1^\circ\text{C}$ por 14 dias em produtos lácteos fermentados com cultura iniciadora FD DVS YF-L812 ou F-DVS CH-1, sozinha (referência), ou culturas iniciadoras em combinação com uma das nove cepas de *Lb. fermentum*. LOD: Limite de detecção. LOQ: Limite de quantificação.

[0080] Figura 21: Níveis de acetaldeído após armazenamento a $7\pm 1^\circ\text{C}$ por 14 dias em produtos lácteos fermentados com cultura iniciadora FD DVS YF-L812 ou F-DVS CH-1, sozinha (referência), ou culturas iniciadoras em combinação com uma das nove cepas de *Lb. fermentum*. LOD: Limite de detecção. LOQ: Limite de quantificação.

Exemplo 1:

Análise semi-quantitativa do efeito inibitório de *Lb. Fermentum* CHCC14591 contra diferentes leveduras e bolores contaminantes e produção de diacetil

[0081] Para a análise semi-quantitativa do efeito inibitório de *Lb. fermentum* CHCC14591, um ensaio de ágar foi utilizado, semelhante ao processo de fabricação e do produto de iogurte:

[0082] O leite homogeneizado com teor de gordura reduzido (1,5%

p/v) foi tratado termicamente a $90\pm 1^\circ\text{C}$ por 20 min e resfriado imediatamente. Uma cultura iniciadora comercial (F-DVS 2,0 Leve) foi inoculada em 0,02% (v/p), e o leite inoculado foi distribuído em garrafas de 200 ml. Uma garrafa foi inoculada com *Lb. fermentum* CHCC14591 em concentração total de 2×10^7 UFC/g, duas garrafas foram inoculadas com duas culturas bioprotetoras comerciais (FreshQ[®]4 e Holdbac[®] YM-C Plus) em dosagens recomendadas (100U/T e 20 DCU/100l para FreshQ[®]4 e Holdbac[®]YM-C Plus, respectivamente), e uma garrafa foi usada como referência e inoculada apenas com a cultura iniciadora. Todas as garrafas foram incubadas em banho-maria a $43\pm 1^\circ\text{C}$ e fermentadas a estas condições até pH de $4,60 \pm 0,1$ ser alcançado. Após a fermentação, as garrafas foram agitadas vigorosamente para quebrar o coágulo e resfriadas em gelo. Então o leite fermentado foi aquecido a uma temperatura de 40°C e adicionados 40 ml de uma solução de 5% de ágar estéril que havia sido derretida e resfriada a 60°C . Esta solução de leite fermentado e ágar foi derramada em placas de Petri estéreis e as placas foram secadas em uma bancada de LAF por 30 min.

[0083] Suspensão de esporos de seis diferentes bolores foram vistas na concentração de 500 esporos/mancha; *Penicillium brevicompactum* (DSM32094), *P. crustosum*, *P. solitum* (DSM32093), *P. carneum*, *P. paneum* e *P. roqueforti*. Três bolores foram vistos em cada prato. Quatro leveduras incluindo *Torulasporea delbrueckii*, *Cryptococcus hansenii*, *Debaryomyces hansenii* e *Yarrowia lipolytica* foram vistas nas concentrações de 10^4 , 10^3 e 10^2 UFC/mancha. As placas foram incubadas à temperatura de $7\pm 1^\circ\text{C}$ e $25\pm 1^\circ\text{C}$ e examinadas regularmente para o crescimento de bolores e leveduras.

[0084] No dia 14 amostras foram analisadas para o diacetil por cromatografia gasosa por headspace estático (HSGC), um método sensível para análise de compostos voláteis em matrizes complexas. A instalação consistia de um amostrador de Head Space estático ligado ao

cromatógrafo de fase gasosa com detector de ionização de chama (FID). Para esse propósito foi utilizado o seguinte equipamento:

[0085] Autoamostrador HS: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.

Software HS: HSControl v.2.00, Perkin Elmer.

GC: Autosystem XL, Perkin Elmer.

Software GC: Turbochrom navigator, Perkin Elmer.

Coluna: HP-FFAP 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, Agilent Technologies

[0086] Padrões de concentração conhecidos foram utilizados para determinar os fatores de resposta (calibração), os controles foram utilizados para controlar os fatores de resposta utilizados se eram estáveis dentro de uma série de análise, assim como entre as séries e ao longo do tempo (meses). Concentração de compostos voláteis (ppm) em amostras e controles foram determinados utilizando fatores de resposta vindo de padrões. Amostras foram preparadas pela adição de 200 µL de 4N H₂SO₄ para 1 g de amostra de iogurte e imediatamente analisadas por HSGC.

[0087] Resultados do ensaio de ágar são apresentados nas Figuras 1-5, mostrando que todos os bolores testados cresceram muito bem nas placas de ágar feitas a partir de leite fermentado apenas com a cultura iniciadora (referência). No entanto, quando *Lb. fermentum* CHCC14591 estava presente durante a fermentação do leite as placas resultantes inibiram o crescimento de todas as espécies de *Penicillium* testadas. O nível de inibição foi comparável ou até mesmo maior do que a inibição observada para as duas culturas bioprotetoras comerciais. A Figura 3 mostra que todas as leveduras testadas cresceram nas placas de ágar feitas a partir de leite fermentado apenas com a cultura iniciadora (referência). Quando *Lb. fermentum* CHCC14591 estava presente durante a fermentação do leite as placas resultantes impediram o crescimento de *C. fragiola* e *Y. lipolytica* adicionadas em todas as concentrações. O

crescimento de *T. delbrueckii* e *D. hansenii* foi inibido nas concentrações inferiores quando *Lb. fermentum* CHCC14591 estava presente durante a fermentação do leite. O nível de inibição foi comparável ou até mesmo maior do que a inibição observada para as duas culturas bioprotetoras comerciais.

[0088] O efeito sobre a produção de diacetil é ilustrado na Figura 6, mostrando que a adição de *Lb. fermentum* CHCC14591 durante a fermentação do leite produz quantidades mínimas de diacetil quando comparado com outras alternativas disponíveis no mercado.

Exemplo 2:

Análise semi-quantitativa do efeito inibitório de *Lb. fermentum* CHCC14591 em combinação com *Lb. rhamnosus* CHCC15860 contra diferentes contaminantes do bolor

[0089] Para a análise semi-quantitativa do efeito inibitório de uma combinação de *Lb. fermentum* CHCC14591 e *Lb. rhamnosus* CHCC15860, um ensaio de ágar foi utilizado, semelhante ao processo de fabricação e do produto de iogurte:

[0090] O leite homogeneizado com teor de gordura reduzido (1,5% p/v) foi tratado termicamente a $90\pm 1^\circ\text{C}$ por 20 min e resfriado imediatamente. Uma cultura iniciadora comercial (F-DVS 2,0 Leve) foi inoculada em 0,02% (v/p), e o leite inoculado foi distribuído em garrafas de 200 ml. Uma garrafa foi inoculada com *Lb. rhamnosus* CHCC15860 em concentração total de 1×10^7 UFC/g, uma garrafa foi inoculada com *Lb. fermentum* CHCC14591 em concentração total de 1×10^7 UFC/g, uma garrafa foi inoculada com *Lb. fermentum* CHCC14591 e *Lb. rhamnosus* CHCC15860 em cada concentração de 5×10^6 UFC/g, e uma garrafa foi usada como referência e inoculada apenas com a cultura iniciadora. Todas as garrafas foram incubadas em banho-maria a $43\pm 1^\circ\text{C}$ e fermentadas a estas condições até pH de $4,60 \pm 0,1$ ser al-

cançado. Após a fermentação, as garrafas foram agitadas vigorosamente para quebrar o coágulo e resfriadas em gelo. Então o leite fermentado foi aquecido a uma temperatura de 40°C e adicionados 40 ml de uma solução de 5% de ágar estéril que havia sido fundida e resfriada a 60°C. Esta solução de leite fermentado e ágar foi derramada em placas de Petri estéreis e as placas foram secadas em uma bancada de LAF por 30 min.

[0091] Suspensão de esporos de três diferentes bolores foram vistas na concentração de 500 esporos/mancha; *P. carneum*, *P. paneum* e *P. roqueforti*. Três bolores foram vistos em cada prato. As placas foram incubadas à temperatura de 25±1°C e examinadas regularmente para o crescimento de bolores.

[0092] Resultados do ensaio de ágar são apresentados na Figura 7, mostrando que todos os bolores testados cresceram muito bem nas placas de ágar feitas a partir de leite fermentado apenas com a cultura iniciadora (referência). No entanto, quando *Lb. rhamnosus* 15860 ou o *Lb. fermentum* CHCC14591 estava presente durante a fermentação do leite as placas resultantes inibiram o crescimento das três espécies de *Penicillium* testadas. Além disso, um efeito inibitório sinérgico foi encontrado quando *Lb. rhamnosus* CHCC15860 e *Lb. fermentum* CHCC14591 foram usadas em combinação em comparação com o efeito inibitório de cada cepa utilizada isoladamente.

Exemplo 3:

Análise semi-quantitativa do efeito inibitório de dez cepas de *Lb. fermentum* contra diferentes contaminantes do bolor

[0093] Para a análise semi-quantitativa do efeito inibitório de dez cepas de *Lb. fermentum*, um ensaio de ágar foi utilizado, semelhante ao processo de fabricação e do produto de iogurte:

[0094] O leite homogeneizado com teor de gordura reduzido (1,5%

p/v) foi tratado termicamente a $90\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 20 min e resfriado imediatamente. Uma cultura iniciadora comercial (F-DVS YF-L901) foi inoculada em 0,02% (v/p), e o leite inoculado foi distribuído em garrafas de 200 ml. Dez garrafas foram inoculadas com as cepas de *Lb. fermentum* em concentrações de 1×10^7 UFC/g e uma garrafa foi usada como referência e inoculada apenas com a cultura iniciadora. Todas as garrafas foram incubadas em banho-maria a $43\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fermentadas a estas condições até pH de $4,60 \pm 0,1$ ser alcançado. Após a fermentação, as garrafas foram agitadas vigorosamente para quebrar o coágulo e resfriadas em gelo. Então o leite fermentado foi aquecido a uma temperatura de 40°C e adicionados 40 ml de uma solução de 5% de ágar estéril que havia sido fundida e resfriada a 60°C . Esta solução de leite fermentado e ágar foi derramada em placas de Petri estéreis e as placas foram secadas em uma bancada de LAF por 30 min.

[0095] As cepas de *Lb. Fermentum* testadas foram: *Lb. fermentum* CHCC12798, *Lb. fermentum* CHCC12797, *Lb. fermentum* CHCC14591, *Lb. fermentum* CHCC14588, *Lb. fermentum* CHCC15844, *Lb. fermentum* CHCC15865, *Lb. fermentum* CHCC15847, *Lb. fermentum* CHCC15848, *Lb. fermentum* CHCC15926 e *Lb. fermentum* CHCC2008.

[0096] Suspensão de esporos de seis diferentes bolores foram vistas na concentração de 500 esporos/mancha; *Penicillium brevicompactum* (DSM32094), *P. crustosum*, *P. solitum* (DSM32093), *P. carneum*, *P. paneum* e *P. roqueforti*. Três bolores foram vistos em cada prato. As placas foram incubadas à temperatura de $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ e examinadas regularmente para o crescimento de bolores.

[0097] No dia 14 amostras foram analisadas para o diacetil por cromatografia gasosa por headspace estático (HSGC), um método sensível para análise de compostos voláteis em matrizes complexas. A instalação consistia de um amostrador de Head Space estático ligado ao

cromatógrafo de fase gasosa com detector de ionização de chama (FID). Para esse propósito foi utilizado o seguinte equipamento:

Autoamostrador HS: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.

Software HS: HSControl v.2.00, Perkin Elmer.

GC: Autosystem XL, Perkin Elmer.

Software GC: Turbochrom navigator, Perkin Elmer.

Coluna: HP-FFAP 25 m x 0,20 mm x 0,33 μ m, Agilent Technologies

[0098] Padrões de concentração conhecidos foram utilizados para determinar os fatores de resposta (calibração), os controles foram utilizados para controlar os fatores de resposta utilizados se eram estáveis dentro de uma série de análise, assim como entre as séries e ao longo do tempo (meses). Concentração de compostos voláteis (ppm) em amostras e controles foram determinados utilizando fatores de resposta vindo de padrões. Amostras foram preparadas pela adição de 200 μ L de 4N H₂SO₄ para 1 g de amostra de iogurte e imediatamente analisadas por HSGC.

[0099] Para controlar o efeito sobre a pós acidificação, as onze amostras de leite fermentado (cultura iniciadora sozinha e cultura iniciadora em combinação com as dez cepas de *Lb. Fermentum*) foram armazenadas a 7 \pm 1°C e 25 \pm 1°C por 28 dias e o pH foi medido nos dias 1, 7, 14, 21 e 28.

[00100] Resultados do ensaio de ágar são apresentados na Figura 8, mostrando que todos os bolores testados cresceram muito bem nas placas de ágar feitas a partir de leite fermentado apenas com a cultura iniciadora (referência). Para *P. brevicompactum* (DSM32094) e *P. solitum* (DSM32093) um grande atraso no crescimento foi observado para todas as cepas de *Lb. fermentum* quando presentes durante a fermentação do leite. Para os bolores restantes testados, uma variação de

atraso no crescimento foi observada quando as cepas de *Lb. Fermentum* estavam presentes durante a fermentação do leite. Bactérias da cepa *Lb. fermentum* CHCC14591 alcançaram inibição significativa de essencialmente todos os bolores testados neste ensaio.

[00101] O efeito sobre a produção de diacetil é ilustrado na Figura 9, mostrando que cada uma das cepas antifúngicas *Lb. fermentum* CHCC12798, *Lb. fermentum* CHCC12797, *Lb. fermentum* CHCC14591, *Lb. fermentum* CHCC14588, *Lb. fermentum* CHCC15844, *Lb. fermentum* CHCC15865, *Lb. fermentum* CHCC15847, *Lb. fermentum* CHCC15848, *Lb. fermentum* CHCC15926 e *Lb. fermentum* CHCC2008 secreta ou nenhum ou muito pouco diacetil.

[00102] Os efeitos da pós-acidificação são ilustrados na Figura 10 e mostram que cada um de *Lb. fermentum* CHCC12798, *Lb. fermentum* CHCC12797, *Lb. fermentum* CHCC14591, *Lb. fermentum* CHCC14588, *Lb. fermentum* CHCC15844, *Lb. fermentum* CHCC15865, *Lb. fermentum* CHCC15847, *Lb. fermentum* CHCC15848, *Lb. fermentum* CHCC15926 e *Lb. fermentum* CHCC2008 não contribui para pós acidificação ou mesmo reduz a pós acidificação em comparação com o iogurte de referência.

[00103] Estes resultados foram inesperados e são altamente significativos, como as bactérias de qualidade alimentar antifúngicas da arte anterior foram observadas para contribuir para a secreção de compostos voláteis e aumentar os efeitos de pós acidificação causados pela cultura iniciadora.

Exemplo 4:

Efeito de uma cepa de *Lb. fermentum* na pós-acidificação

[00104] Uma cepa de *Lb. fermentum* (CHCC14591) foi testada para o efeito na pós-acidificação.

[00105] O leite homogeneizado com teor de gordura reduzido (1,5%

p/v) foi tratado termicamente a $90\pm 1^\circ\text{C}$ por 20 min e resfriado imediatamente. Uma cultura iniciadora comercial (F-DVS 2,0 Leve) foi inoculada em 0,02% (v/p), e o leite inoculado foi distribuído em garrafas de 200 ml. Uma garrafa foi inoculada com *Lb. fermentum* CHCC14591 em concentração total de 2×10^7 UFC/g, duas garrafas foram inoculadas com duas culturas bioprotetoras comerciais (FreshQ[®]4 e Holdbac[®] YM-C Plus) em dosagens recomendadas (100U/T e 20 DCU/100l para FreshQ[®]4 e Holdbac[®]YM-C Plus, respectivamente), e uma garrafa foi usada como referência e inoculada apenas com a cultura iniciadora. Todas as garrafas foram incubadas em banho-maria a $43\pm 1^\circ\text{C}$ e fermentadas a estas condições até pH de $4,60 \pm 0,1$ ser alcançado. Após a fermentação, as garrafas foram agitadas vigorosamente para quebrar o coágulo e resfriadas em gelo.

[00106] Para controlar o efeito sobre a pós acidificação, as quatro amostras de leite fermentado (cultura iniciadora sozinha, FreshQ[®]4, Holdbac[®] YM-C Plus e *Lb. fermentum* CHCC14591) foram armazenadas a $7\pm 1^\circ\text{C}$ e $25\pm 1^\circ\text{C}$ por 21 dias e o pH foi medido no dia 1, 7, 14 e 21.

[00107] O efeito sobre a pós-acidificação é ilustrado na Figura 11, mostrando que a adição de *Lb. fermentum* CHCC14591 durante a fermentação do leite previne a pós-acidificação dos produtos lácteos fermentados. A cultura iniciadora sozinha produz uma ligeira pós-acidificação e as duas culturas bioprotetoras comerciais ambas contribuem para a pós-acidificação.

Exemplo 5:

Efeito de 10 cepas de *Lb. Fermentum* no teor de acetaldeído

[00108] 10 cepas de *Lb. Fermentum* foram testadas quanto à sua capacidade de reduzir o teor de acetaldeído.

[00109] O leite homogeneizado com teor de gordura reduzido (1,5% p/v) foi tratado termicamente a $90\pm 1^\circ\text{C}$ por 20 min e resfriado imediatamente. Uma cultura iniciadora comercial (F-DVS YF-L901 Yo-Flex[®]) foi

inoculada em 0,02% (v/p), e o leite inoculado foi distribuído em garrafas de 200 mL. Dez garrafas foram inoculadas com as cepas de *Lb. fermentum* em concentrações de 1×10^7 UFC/g e uma garrafa foi usada como referência e inoculada apenas com a cultura iniciadora. Todas as garrafas foram incubadas em banho-maria a $43 \pm 1^\circ\text{C}$ e fermentadas a estas condições até pH de $4,60 \pm 0,1$ ser alcançado. Após a fermentação, as garrafas foram agitadas vigorosamente para quebrar o coágulo e resfriadas em gelo. As placas foram armazenadas a $7 \pm 1^\circ\text{C}$ por 14 dias.

[00110] No dia 14 amostras foram analisadas para o acetaldeído por cromatografia gasosa por headspace estático (HSGC), um método sensível para análise de compostos voláteis em matrizes complexas. A instalação consistia de um amostrador de Head Space estático ligado ao cromatógrafo de fase gasosa com detector de ionização de chama (FID). Para esse propósito foi utilizado o seguinte equipamento:

Autoamostrador HS: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.

Software HS: HSControl v.2.00, Perkin Elmer.

GC: Autosystem XL, Perkin Elmer.

Software GC: Turbochrom navigator, Perkin Elmer.

Coluna: HP-FFAP 25 m x 0,20 mm x 0,33 μm , Agilent Technologies

[00111] Padrões de concentração conhecidos foram utilizados para determinar os fatores de resposta (calibração), os controles foram utilizados para controlar os fatores de resposta utilizados se eram estáveis dentro de uma série de análise, assim como entre as séries e ao longo do tempo (meses). Concentração de compostos voláteis (ppm) em amostras e controles foram determinados utilizando fatores de resposta vindo de padrões. Amostras foram preparadas pela adição de 200 μL de 4N H_2SO_4 para 1 g de amostra de iogurte e imediatamente analisadas por HSGC.

[00112] Os resultados são ilustrados na Figura 12 e mostram que

cada uma das cepas de *Lb. fermentum* CHCC12798, *Lb. fermentum* CHCC12797, *Lb. fermentum* CHCC14591, *Lb. fermentum* CHCC14588, *Lb. fermentum* CHCC15844, *Lb. fermentum* CHCC15865, *Lb. fermentum* CHCC15847, *Lb. fermentum* CHCC15848, *Lb. fermentum* CHCC15926 e *Lb. fermentum* CHCC2008 tem a capacidade de reduzir a concentração do acetaldeído produzido por uma cultura iniciadora durante a fermentação em um produto lácteo fermentado.

Exemplo 6:

Efeito de uma cepa de *Lb. fermentum* no teor de acetaldeído

[00113] Uma cepa de *Lb. fermentum* foi testada quanto à sua capacidade de reduzir o teor de acetaldeído.

[00114] O leite homogeneizado com teor de gordura reduzido (1,5% p/v) foi tratado termicamente a $90\pm 1^\circ\text{C}$ por 20 min e resfriado imediatamente. Uma cultura iniciadora comercial (F-DVS Mild 2.0) foi inoculada em 0,02% (v/p), e o leite inoculado foi distribuído em duas garrafas de 200 ml. Uma garrafa foi inoculada com as cepas de *Lb. fermentum* em concentrações de 1×10^7 UFC/g e uma garrafa foi usada como referência e inoculada apenas com a cultura iniciadora. Ambas as garrafas foram incubadas em banho-maria a $43\pm 1^\circ\text{C}$ e fermentadas a estas condições até pH de $4,60 \pm 0,1$ ser alcançado. Após a fermentação, as garrafas foram agitadas vigorosamente para quebrar o coágulo e resfriadas em gelo. As placas foram armazenadas a $7\pm 1^\circ\text{C}$ por 14 dias.

[00115] No dia 14 amostras foram analisadas para o acetaldeído por cromatografia gasosa por headspace estático (HSGC), um método sensível para análise de compostos voláteis em matrizes complexas. A instalação consistia de um amostrador de Head Space estático ligado ao cromatógrafo de fase gasosa com detector de ionização de chama (FID). Para esse propósito foi utilizado o seguinte equipamento:

Autoamostrador HS: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.

Software HS: HSControl v.2.00, Perkin Elmer.

GC: Autosystem XL, Perkin Elmer.
Software GC: Turbochrom navigator, Perkin Elmer.
Coluna: HP-FFAP 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, Agilent Technologies

[00116] Padrões de concentração conhecidos foram utilizados para determinar os fatores de resposta (calibração), os controles foram utilizados para controlar os fatores de resposta utilizados se eram estáveis dentro de uma série de análise, assim como entre as séries e ao longo do tempo (meses). Concentração de compostos voláteis (ppm) em amostras e controles foram determinados utilizando fatores de resposta vindo de padrões. Amostras foram preparadas pela adição de 200 µL de 4N H₂SO₄ para 1 g de amostra de iogurte e imediatamente analisadas por HSGC.

[00117] Os resultados são ilustrados na Figura 13 e mostram que a *Lb. fermentum* CHCC14591 tem a capacidade de reduzir a concentração de acetaldeído produzido por uma cultura iniciadora durante a fermentação em um produto lácteo fermentado.

Exemplo 7:

Análise funcional de culturas iniciadoras comerciais

[00118] As quatro culturas iniciadoras comerciais incluídas aqui foram escolhidas com base em seus diferentes perfis de acidificação. Três foram congeladas, F-DVS CH-1, F-DVS YoFlex Mild 2.0 e F-DVS YF-L901 e uma secada por congelamento FD-DVS YF-L812. Para testar a diferença de perfis de acidificação, o leite semidesnatado foi padronizado para 1% de gordura e 4,5% de proteína com leite desnatado em pó e tratado termicamente a 85±1°C por 30 min e resfriado imediatamente. Uma de quatro culturas iniciadoras comerciais diferentes (F-DVS CH-1, F-DVS YoFlex Mild 2.0, F-DVS YF-L901 ou FD-DVS YF-L812) foi inoculada em 0,02% (v/p), e o leite inoculado foi distribuído em garrafas de 200 ml. As garrafas

foram incubadas em banho-maria a $43\pm 1^\circ\text{C}$ e fermentadas a estas condições até pH de 4,5 ser alcançado. O pH foi medido continuamente durante a fermentação. Posteriormente, as garrafas foram armazenadas a 6°C por 43 dias e o pH foi medido com intervalos de 7 dias, para determinar o nível de pós-acidificação.

[00119] Os perfis de acidificação das quatro culturas iniciadoras comerciais, F-DVS CH-1, F-DVS YoFlex Mild 2.0, F-DVS YF-L901 e FD-DVS YF-L812, são mostrados na Figura 14. F-DVS CH-1 apresentou tempo de fermentação rápida atingindo pH 4,55 em 4,87 horas. F-DVS YoFlex Mild 2.0 apresentou tempo de fermentação rápida atingindo pH 4,55 em 5,29 horas. FD-DVS 6290-L812 e F-DVS 6290-L901 apresentaram fermentação mais lento atingindo pH 4,55 em 6,45 e 5,87 horas, respectivamente. Perfis de pós-acidificação apresentaram níveis muito baixos de pós-acidificação para FD-DVS YF-L812 e F-DVS YoFlex Mild 2.0 ($\Delta\text{pH}=0,12$ e $\Delta\text{pH}=0,11$ após o armazenamento a 6°C por 43 dias), níveis intermédios de pós-acidificação de F-DVS YF-L901 ($\Delta\text{pH}=0,26$ após o armazenamento a 6°C por 43 dias) e alto grau de pós-acidificação de F-DVS CH-1 ($\Delta\text{pH}=0,55$ após o armazenamento a 6°C por 43 dias) (Figura 15).

Exemplo 8:

Análise semi-quantitativa do efeito inibitório de nove cepas de *Lb. fermentum* contra diferentes contaminantes do bolor quando fermentadas com duas culturas iniciadoras diferentes

[00120] Para a análise semi-quantitativa do efeito inibitório de nove cepas de *Lb. fermentum*, um ensaio de ágar foi utilizado, semelhante ao processo de fabricação e do produto de iogurte:

[00121] O leite homogeneizado com teor de gordura reduzido (1,5% p/v) foi tratado termicamente a $90\pm 1^\circ\text{C}$ por 20 min e resfriado imediatamente. O leite foi inoculado com uma das duas culturas iniciadoras comerciais (F-DVS CH-1 ou FD-DVS YF-L812) a 0,02% (v/p), e o leite inoculado foi distribuído em garrafas de 200 ml. Nove garrafas inoculadas

com cada cultura iniciadora foram posteriormente inoculadas com as cepas de *Lb. fermentum* em concentrações de 1×10^7 UFC/g e uma garrafa inoculada com cada cultura iniciadora foi usada como referência e inoculada apenas com a cultura iniciadora. Todas as garrafas foram incubadas em banho-maria a $43 \pm 1^\circ\text{C}$ e fermentadas a estas condições até pH de $4,55 \pm 0,1$ ser alcançado. Após a fermentação, as garrafas foram agitadas vigorosamente para quebrar o coágulo e resfriadas em gelo. Então o leite fermentado foi aquecido a uma temperatura de 40°C e adicionados 40 ml de uma solução de 5% de ágar estéril que havia sido fundida e resfriada a 60°C . Esta solução de leite fermentado e ágar foi derramada em placas de Petri estéreis e as placas foram secadas em uma bancada de LAF por 30 min.

[00122] As cepas de *Lb. Fermentum* testadas foram: *Lb. fermentum* CHCC12798, *Lb. fermentum* CHCC12797, *Lb. fermentum* CHCC14591, *Lb. fermentum* CHCC14588, *Lb. fermentum* CHCC15844, *Lb. fermentum* CHCC15865, *Lb. fermentum* CHCC15847, *Lb. fermentum* CHCC15926 e *Lb. fermentum* CHCC2008.

[00123] Suspensões de esporos de dois diferentes bolores foram vistas na concentração de 500 esporos/mancha; *Penicillium brevicompactum* (DSM32094) e *P. solitum* (DSM32093). Um bolor foi visto em cada placa. As placas foram incubadas à temperatura de $7 \pm 1^\circ\text{C}$ e $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e examinadas regularmente para o crescimento de bolores.

[00124] No dia 14 amostras foram analisadas para o diacetil por cromatografia gasosa por headspace estático (HSGC), um método sensível para análise de compostos voláteis em matrizes complexas. A instalação consistia de um amostrador de Head Space estático ligado ao cromatógrafo de fase gasosa com detector de ionização de chama (FID). Para esse propósito foi utilizado o seguinte equipamento:

Autoamostrador HS: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.

Software HS: HSControl v.2.00, Perkin Elmer.

GC: Autosystem XL, Perkin Elmer.
Software GC: Turbochrom navigator, Perkin Elmer.
Coluna: HP-FFAP 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, Agilent Technologies

[00125] Padrões de concentração conhecidos foram utilizados para determinar os fatores de resposta (calibração), os controles foram utilizados para controlar os fatores de resposta utilizados se eram estáveis dentro de uma série de análise, assim como entre as séries e ao longo do tempo (meses). Concentração de compostos voláteis (ppm) em amostras e controles foram determinados utilizando fatores de resposta vindo de padrões. Amostras foram preparadas pela adição de 200 µL de 4N H₂SO₄ para 1 g de amostra de iogurte e imediatamente analisadas por HSGC.

[00126] Resultados do ensaio de ágar são apresentados nas Figuras 16-19, mostrando que ambos os bolores testados cresceram muito bem nas placas de ágar feitas a partir de leite fermentado apenas com uma das culturas iniciadoras (referência). Para *P. brevicompactum* (DSM32094) e *P. solitum* (DSM32093) um grande atraso no crescimento foi observado para todas as cepas de *Lb. Fermentum* quando presentes durante a fermentação do leite independente da cultura iniciadora usada.

[00127] O efeito sobre a produção de diacetil é ilustrado na Figura 20, mostrando que cada uma das cepas antifúngicas *Lb. fermentum* CHCC12798, *Lb. fermentum* CHCC12797, *Lb. fermentum* CHCC14591, *Lb. fermentum* CHCC14588, *Lb. fermentum* CHCC15844, *Lb. fermentum* CHCC15865, *Lb. fermentum* CHCC15847, *Lb. fermentum* CHCC15926, *Lb. fermentum* CHCC2008 e *Lb. fermentum* CHCC2008 não adiciona diacetil para o nível produzido pela cultura iniciadora.

[00128] Estes resultados foram inesperados e são altamente significativos, como as bactérias de qualidade alimentar antifúngicas da arte

anterior foram observadas para contribuir para a secreção de compostos voláteis pela cultura iniciadora.

Exemplo 9:

Efeito das nove cepas de *Lb. fermentum* em teor de acetaldeído quando fermentadas com duas diferentes culturas iniciadoras

[00129] Nove cepas de *Lb. Fermentum* foram testadas quanto à sua capacidade de reduzir o teor de acetaldeído.

[00130] O leite homogeneizado com teor de gordura reduzido (1,5% p/v) foi tratado termicamente a $90\pm 1^\circ\text{C}$ por 20 min e resfriado imediatamente. O leite foi inoculado com uma das duas culturas iniciadoras comerciais (F-DVS CH-1 ou FD-DVS YF-L812) a 0,02% (v/p), e o leite inoculado foi distribuído em garrafas de 200 ml. Nove garrafas foram inoculadas com cepas de *Lb. fermentum* em concentrações de 1×10^7 UFC/g e uma garrafa inoculada com cada cultura iniciadora foi usada como referência e inoculada apenas com a cultura iniciadora. Todas as garrafas foram incubadas em banho-maria a $43\pm 1^\circ\text{C}$ e fermentadas a estas condições até pH de $4,55 \pm 0,1$ ser alcançado. Após a fermentação, as garrafas foram agitadas vigorosamente para quebrar o coágulo e resfriadas em gelo. As placas foram armazenadas a $7\pm 1^\circ\text{C}$ por 14 dias.

[00131] As cepas de *Lb. Fermentum* testadas foram: *Lb. fermentum* CHCC12798, *Lb. fermentum* CHCC12797, *Lb. fermentum* CHCC14591, *Lb. fermentum* CHCC14588, *Lb. fermentum* CHCC15844, *Lb. fermentum* CHCC15865, *Lb. fermentum* CHCC15847, *Lb. fermentum* CHCC15926 e *Lb. fermentum* CHCC2008.

[00132] No dia 14 amostras foram analisadas para o acetaldeído por cromatografia gasosa por headspace estático (HSGC), um método sensível para análise de compostos voláteis em matrizes complexas.

A instalação consistia de um amostrador de Head Space estático ligado ao cromatógrafo de fase gasosa com detector de ionização de chama (FID). Para esse propósito foi utilizado o seguinte equipamento: Autoamostrador HS: HS40XI, TurboMatrix 110, Perkin Elmer.

Software HS: HSControl v.2.00, Perkin Elmer.

GC: Autosystem XL, Perkin Elmer.

Software GC: Turbochrom navigator, Perkin Elmer.

Coluna: HP-FFAP 25 m x 0,20 mm x 0,33 µm, Agilent Technologies

[00133] Padrões de concentração conhecidos foram utilizados para determinar os fatores de resposta (calibração), os controles foram utilizados para controlar os fatores de resposta utilizados se eram estáveis dentro de uma série de análise, assim como entre as séries e ao longo do tempo (meses). Concentração de compostos voláteis (ppm) em amostras e controles foram determinados utilizando fatores de resposta vindo de padrões. Amostras foram preparadas pela adição de 200 µL de 4N H₂SO₄ para 1 g de amostra de iogurte e imediatamente analisadas por HSGC.

[00134] Os resultados são ilustrados na Figura 21 e mostram que cada uma das cepas de *Lb. fermentum* CHCC12798, *Lb. fermentum* CHCC12797, *Lb. fermentum* CHCC14591, *Lb. fermentum* CHCC14588, *Lb. fermentum* CHCC15844, *Lb. fermentum* CHCC15865, *Lb. fermentum* CHCC15847, *Lb. fermentum* CHCC15926 e *Lb. fermentum* CHCC2008 tem a capacidade de reduzir a concentração do acetaldeído produzido por uma cultura iniciadora durante a fermentação em um produto lácteo fermentado.

REFERÊNCIAS:

EP0221499

EP0576780

EP1442113

US5,378,458

EP2 693885

EP13717237

EP13714671

Gerez *et al.*, Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria, *Biological Control*, vol. 64 (2013): 231-237

Aunsbjerg *et al.*, Contribution of volatiles to the antifungal effect of *Lactobacillus paracasei* in defined medium and yoghurt, *Int J Food Microbiology*, vol. 194 (2015): 46-53

Kosikowski, F.V. and Mistry, V.V., "Cheese and Fermented Milk Foods", 1997, 3^a Ed. F.V. Kosikowski, L.L.C. Westport, CT

Depósitos e Solução técnica

[00135] O requerente solicita que uma amostra dos micro-organismos depositados indicados abaixo só pode ser disponibilizada a um especialista, até a data de concessão da patente.

[00136] Cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC12798 foi depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig depositada em 16/07/2015 sob N^o. de acesso: 32084.

[00137] Cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC12797 foi depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig depositada em 16/07/2015 sob N^o. de acesso: 32085.

[00138] Cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC14591 foi depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig depositada em 16/07/2015 sob N^o. de acesso: 32086.

[00139] Cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC14588 foi depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig depositada em 16/07/2015 sob N.º. de acesso: 32087.

[00140] Cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC15844 foi depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig depositada em 16/07/2015 sob N.º. de acesso: 32088.

[00141] Cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC15865 foi depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig depositada em 16/07/2015 sob N.º. de acesso: 32089.

[00142] Cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC15847 foi depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig depositada em 16/07/2015 sob N.º. de acesso: 32090.

[00143] Cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC15848 foi depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig depositada em 16/07/2015 sob N.º. de acesso: 32091.

[00144] Cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC15926 foi depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig depositada em 22/07/2015 sob N.º. de acesso: 32096.

[00145] Cepa de *Lactobacillus fermentum* CHCC2008 foi depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig depositada em 19/05/2009 sob N.º. de acesso: 22584.

[00146] Cepa de *Lactobacillus rhamnosus* CHCC15860 foi depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig depositada em 16/07/2015 sob N.º. de acesso: 32092.

[00147] Cepa de *Penicillium solitum* CHCC16948 foi depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig depositada em 16/07/2015 sob N.º. de acesso: 32093.

[00148] Cepa de *Penicillium brevicompactum* CHCC16935 foi depositada em Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ), Inhoffenstr. 7B, D-38124 Braunschweig depositada em 16/07/2015 sob N.º. de acesso: 32094.

[00149] Os depósitos foram feitos de acordo com o Tratado de Budapeste sobre o reconhecimento internacional do depósito de microrganismos para efeitos de procedimento de patentes.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende a cepa *Lactobacillus rhamnosus*, CHCC15860 como depositada na Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ) sob N°. de acesso: DSM32092,

em que a composição é uma cultura iniciadora sólida congelada ou liofilizada composta por bactérias formadoras de ácido láctico em uma concentração de pelo menos 10^9 unidades formadoras de colônias por grama de material congelado ou liofilizado.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende ainda a cepa de *Lactobacillus fermentum* depositada como DSM32086.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a composição é uma cultura iniciadora sólida congelada ou liofilizada composta por bactérias formadoras de ácido láctico em uma concentração de pelo menos 10^{10} unidades formadoras de colônias por grama de material congelado ou liofilizado ou em uma concentração de pelo menos 10^{11} unidades formadoras de colônias por grama de material congelado ou liofilizado.

4. Método para produção de um produto lácteo fermentado, caracterizado pelo fato de que compreende a adição da bactéria *Lactobacillus rhamnosus*, CHCC15860 como depositada na Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ) sob N°. de acesso: DSM32092, ou compreende a adição da composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, no leite ou um produto lácteo, e fermentação da mistura a uma temperatura entre cerca de 22°C e 43°C, até um pH inferior a 4,6 ser atingido.

5. Método para produção de um alimento, ração ou produto

farmacêutico, caracterizado pelo fato de que compreende um método para produzir um produto lácteo fermentado, como definido na reivindicação 4.

6. Alimento, ração ou produto farmacêutico, caracterizado(a) pelo fato de que compreende uma bactéria da espécie *Lactobacillus rhamnosus*, CHCC15860 como depositada na Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ) sob N^o. de acesso: DSM32092, ou compreende a composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

7. Uso da bactéria da espécie *Lactobacillus rhamnosus*, CHCC15860 como depositada na Coleção alemã de micro-organismos e culturas de células (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; DSMZ) sob N^o. de acesso: DSM32092, ou da composição, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que é para preparar alimento, ração ou produto farmacêutico.

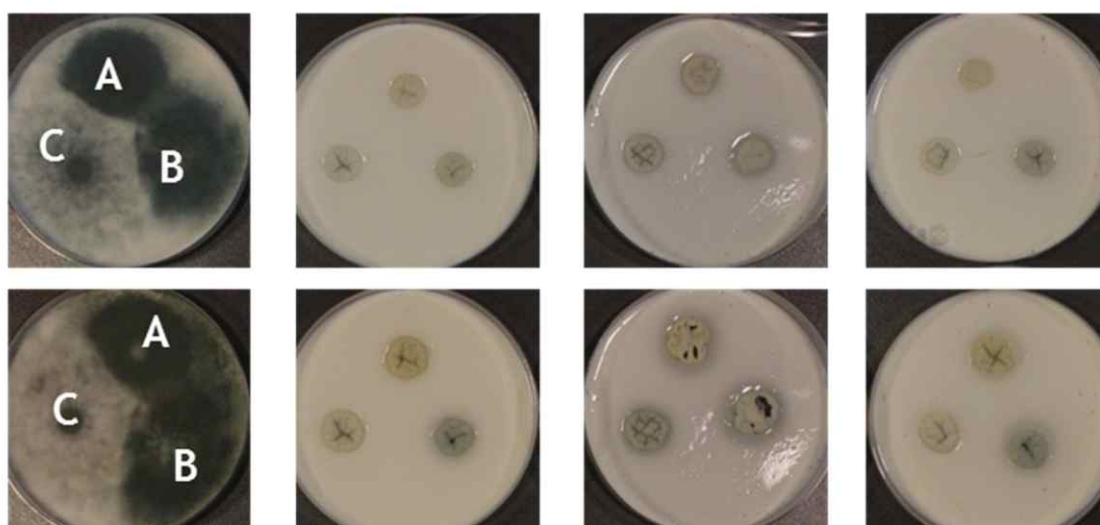


FIG. 1

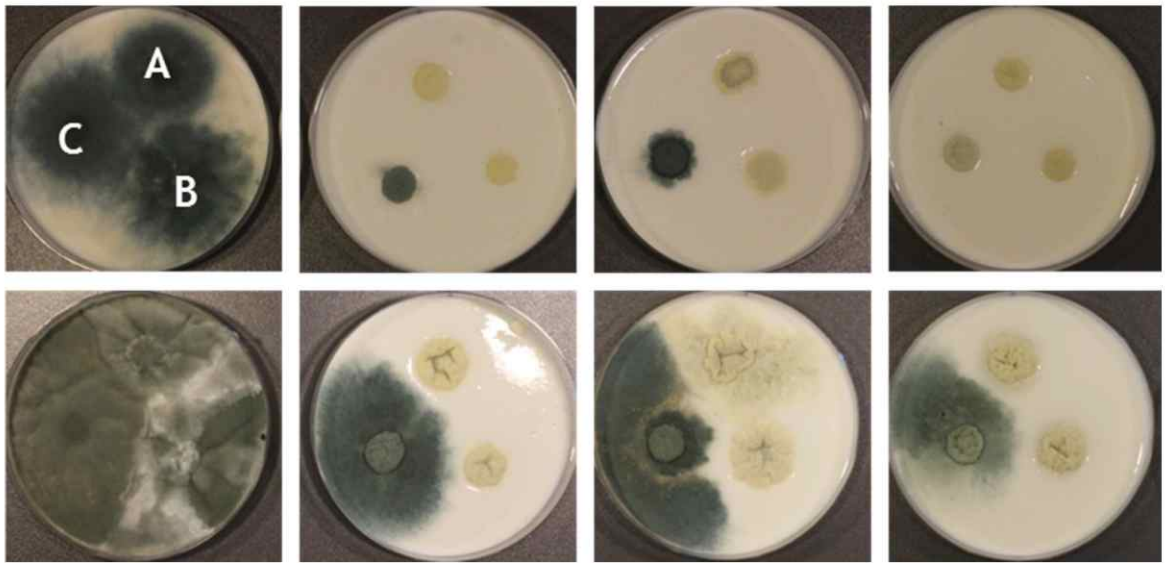


FIG. 2

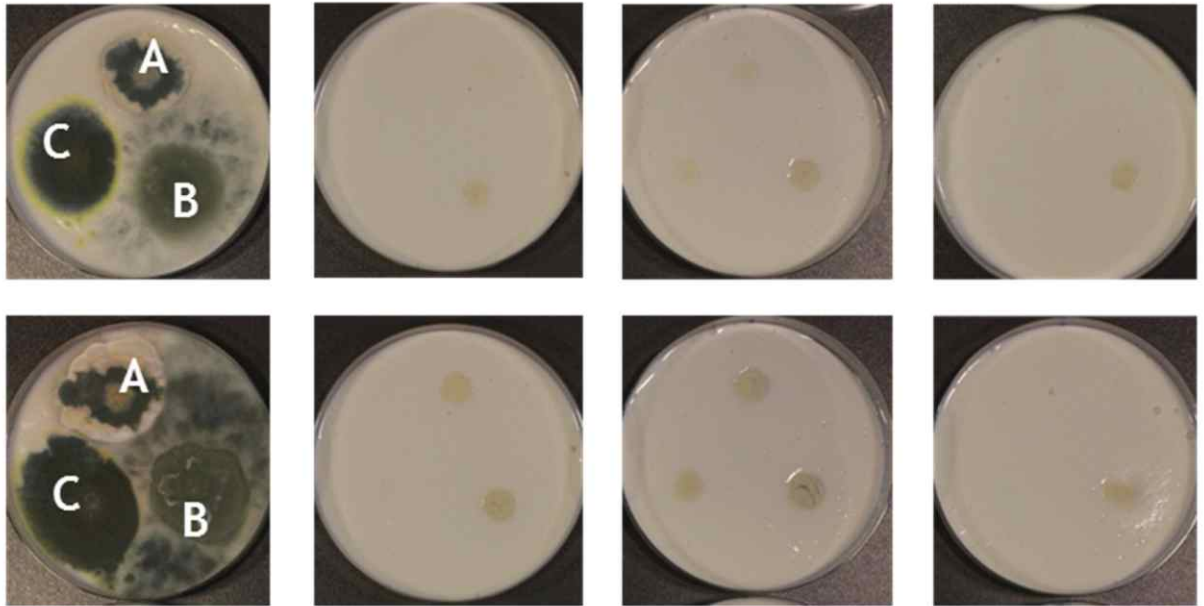


FIG. 3

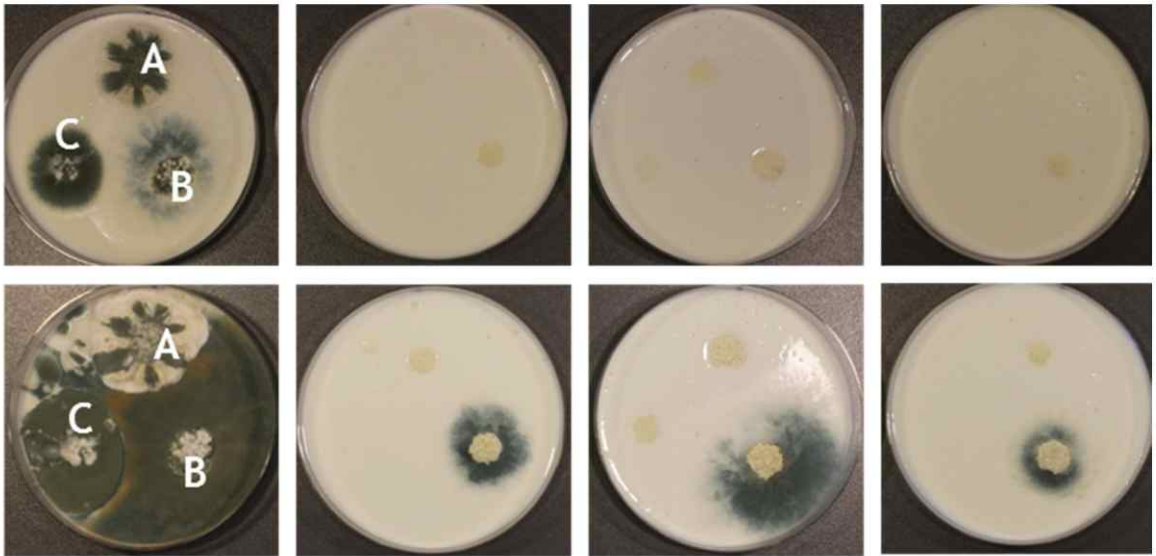


FIG. 4

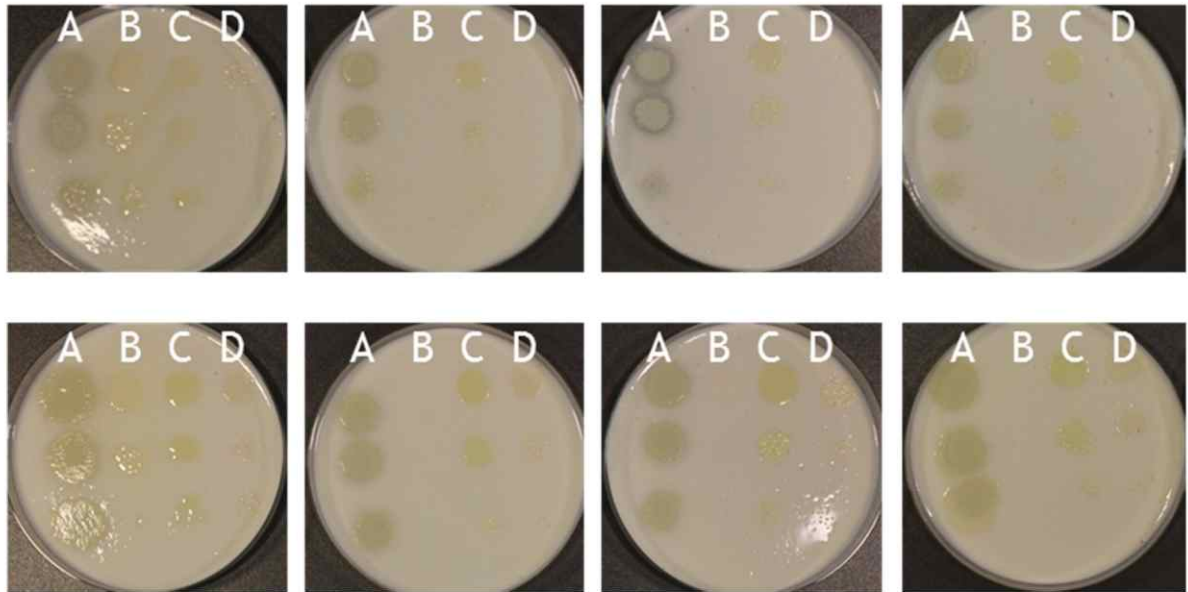


FIG. 5

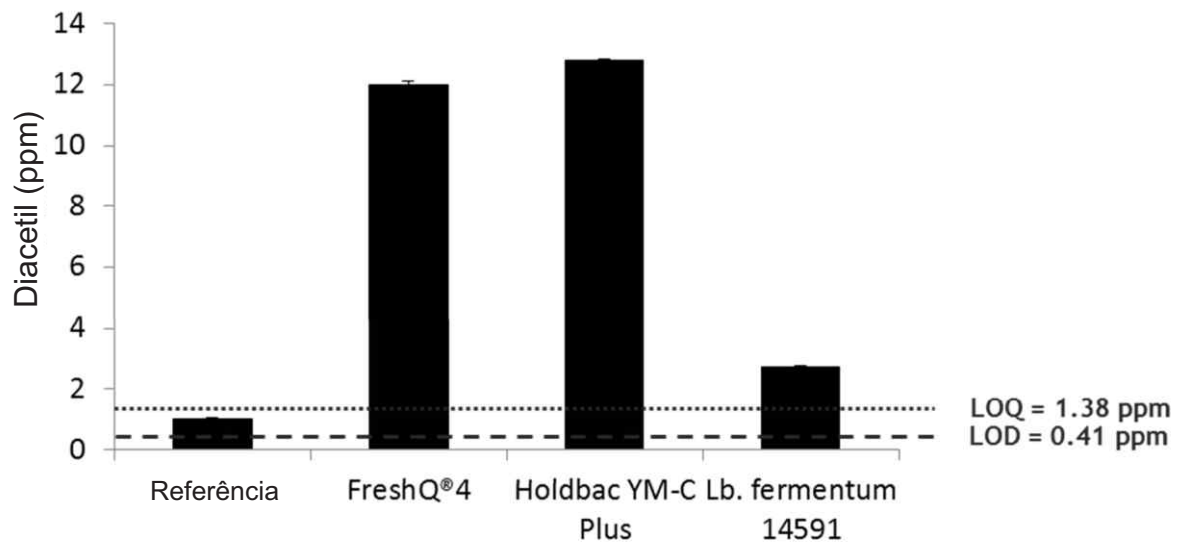


FIG. 6

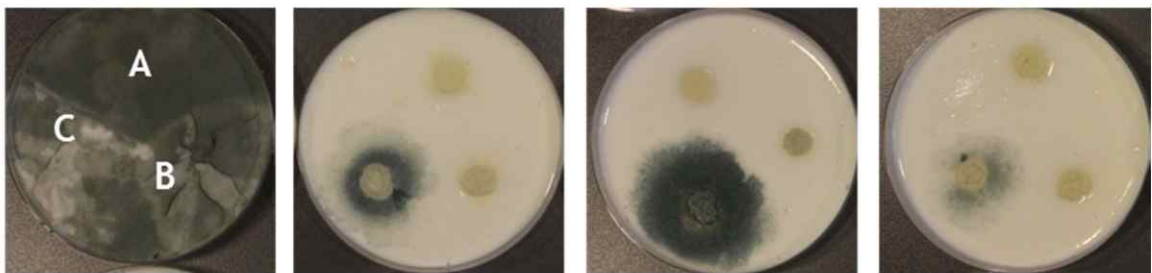


FIG. 7

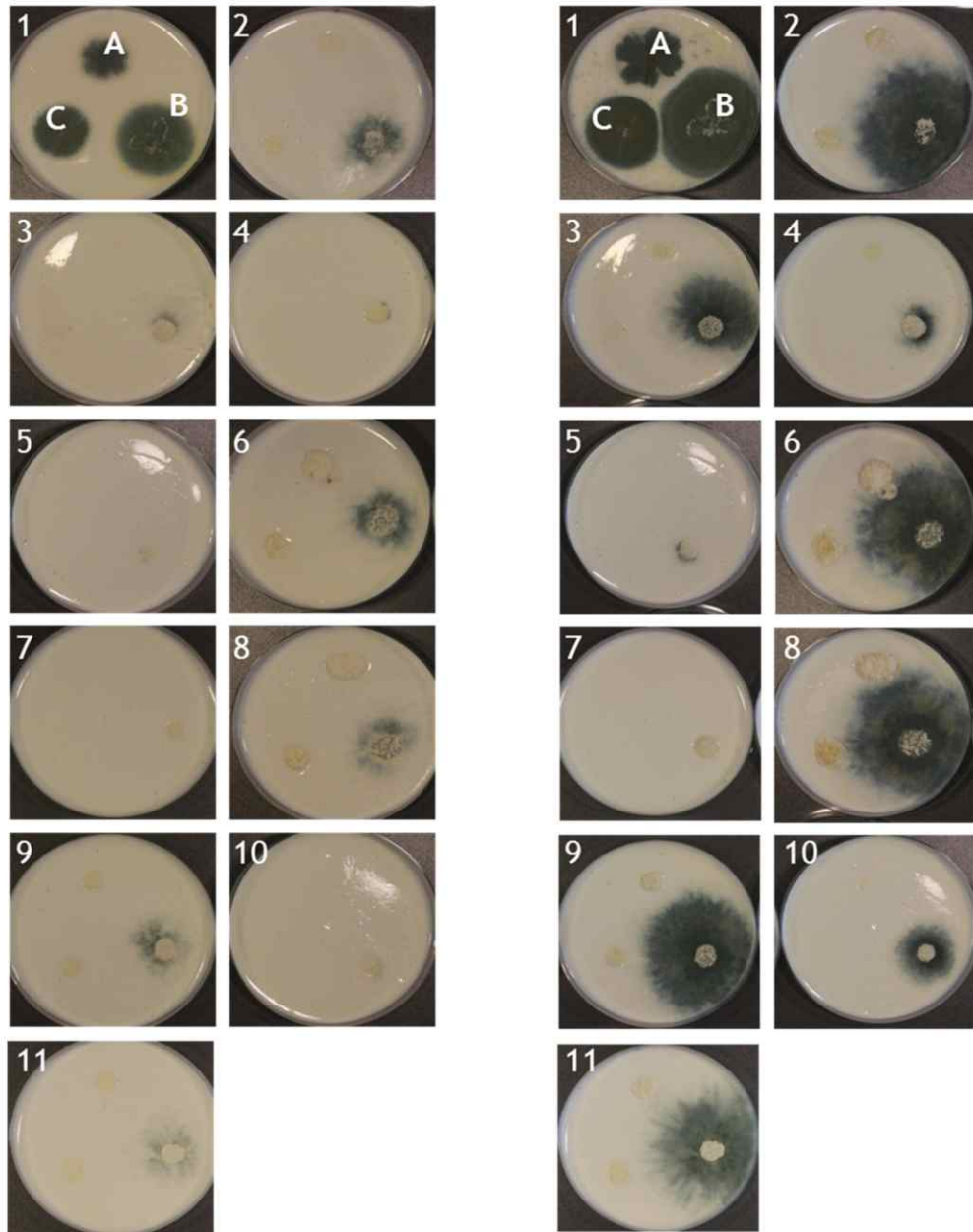


FIG. 8

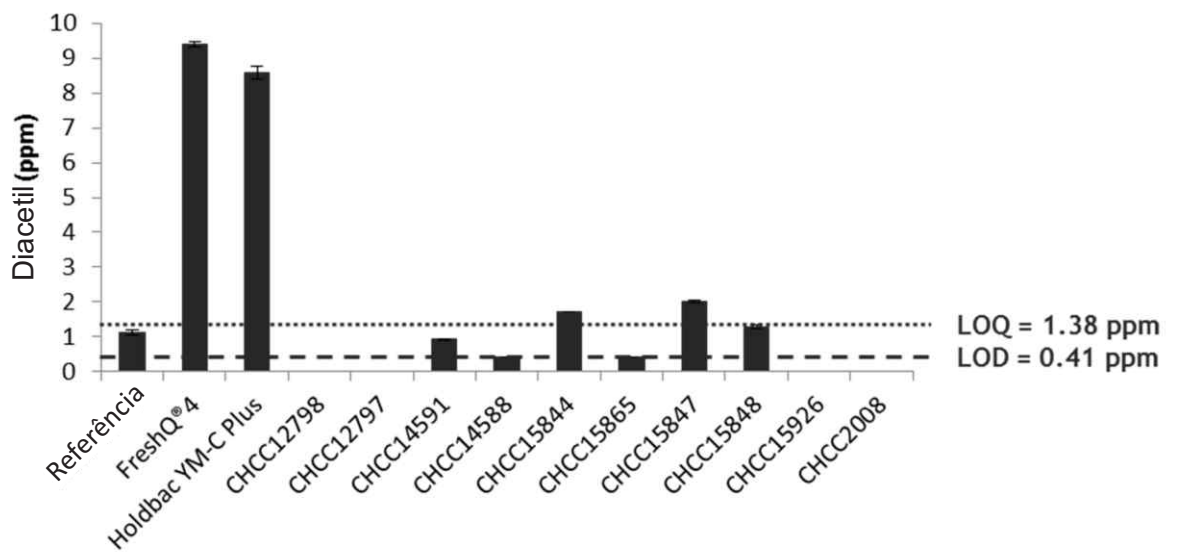


FIG. 9

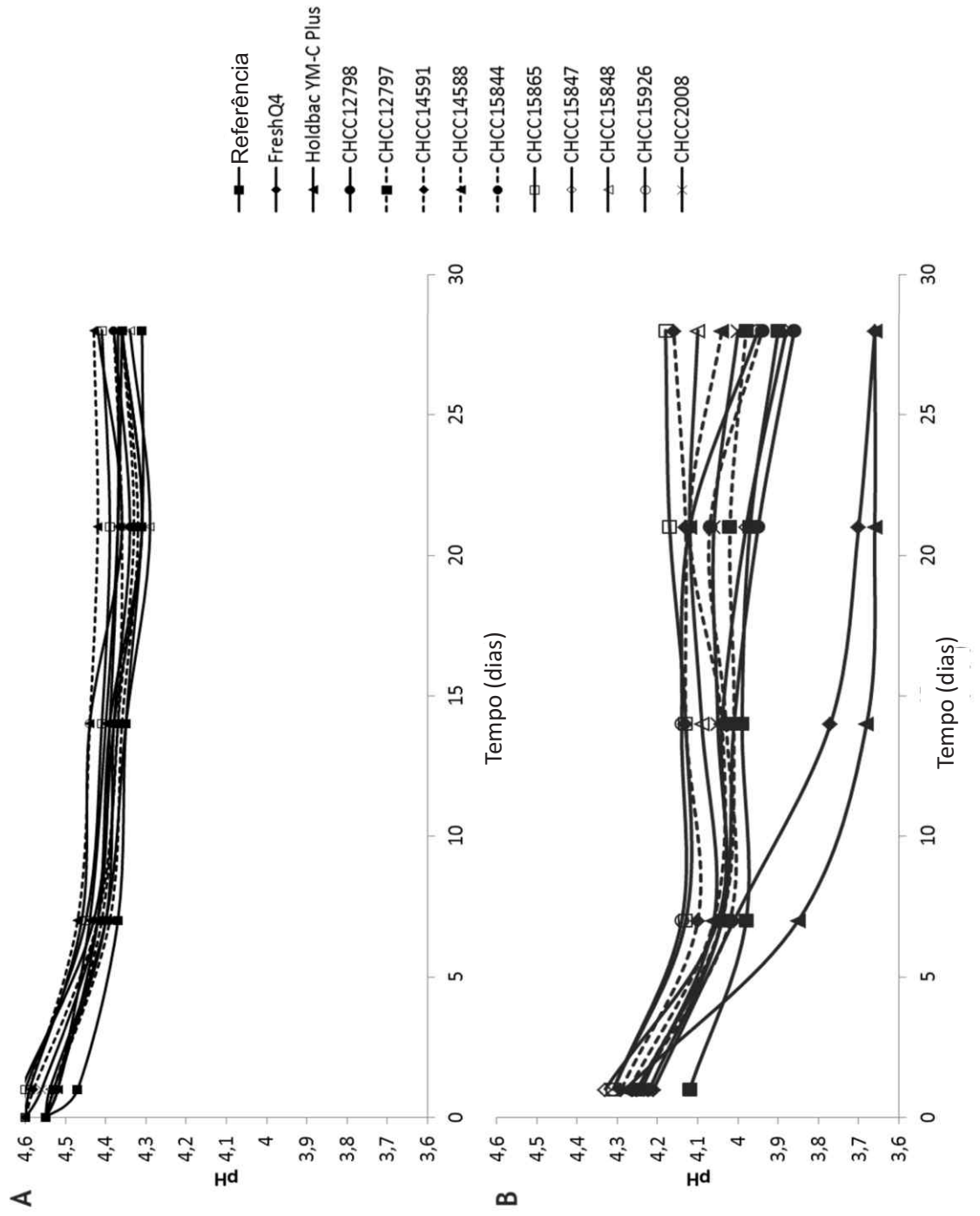


FIG. 10

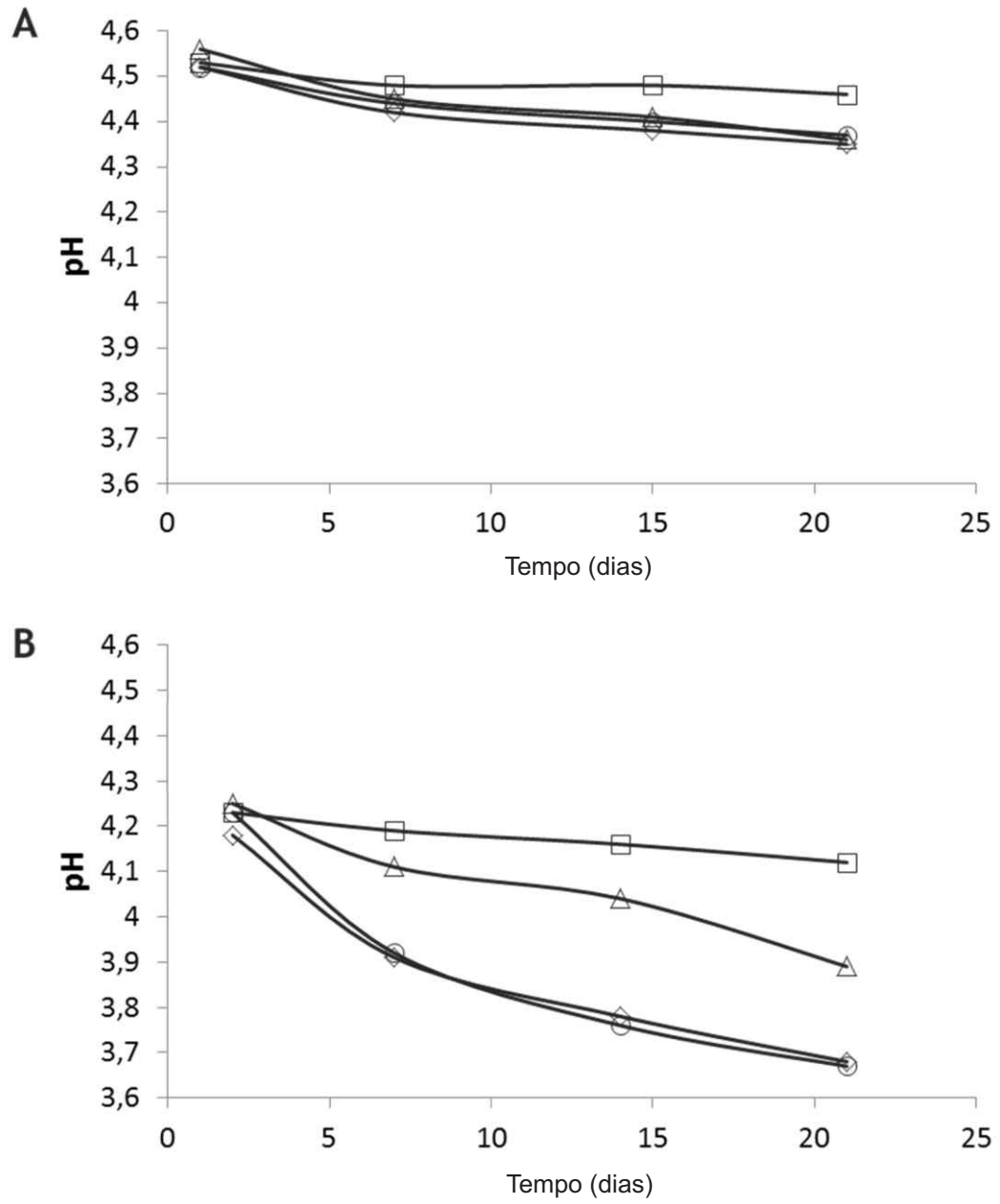


FIG. 11

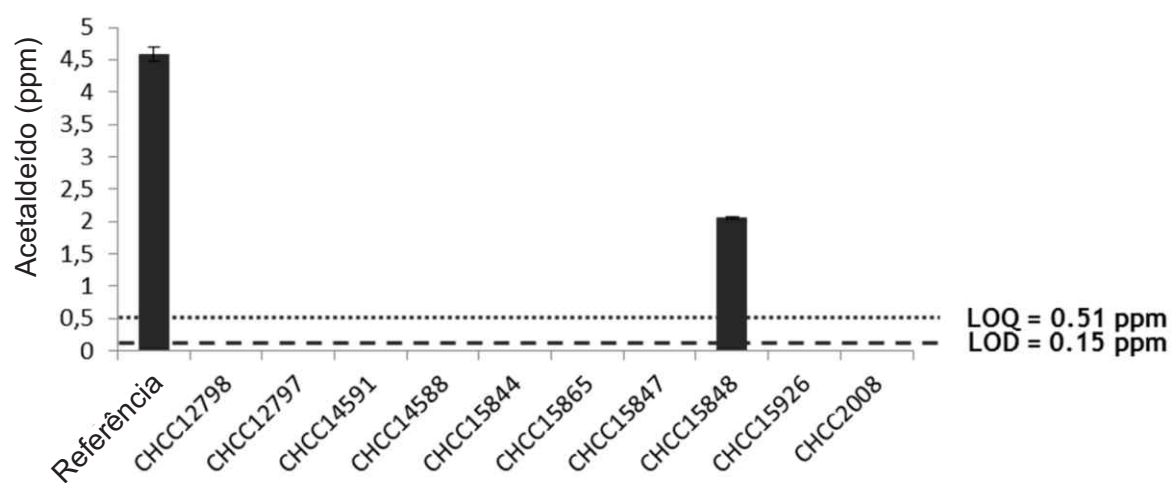


FIG. 12

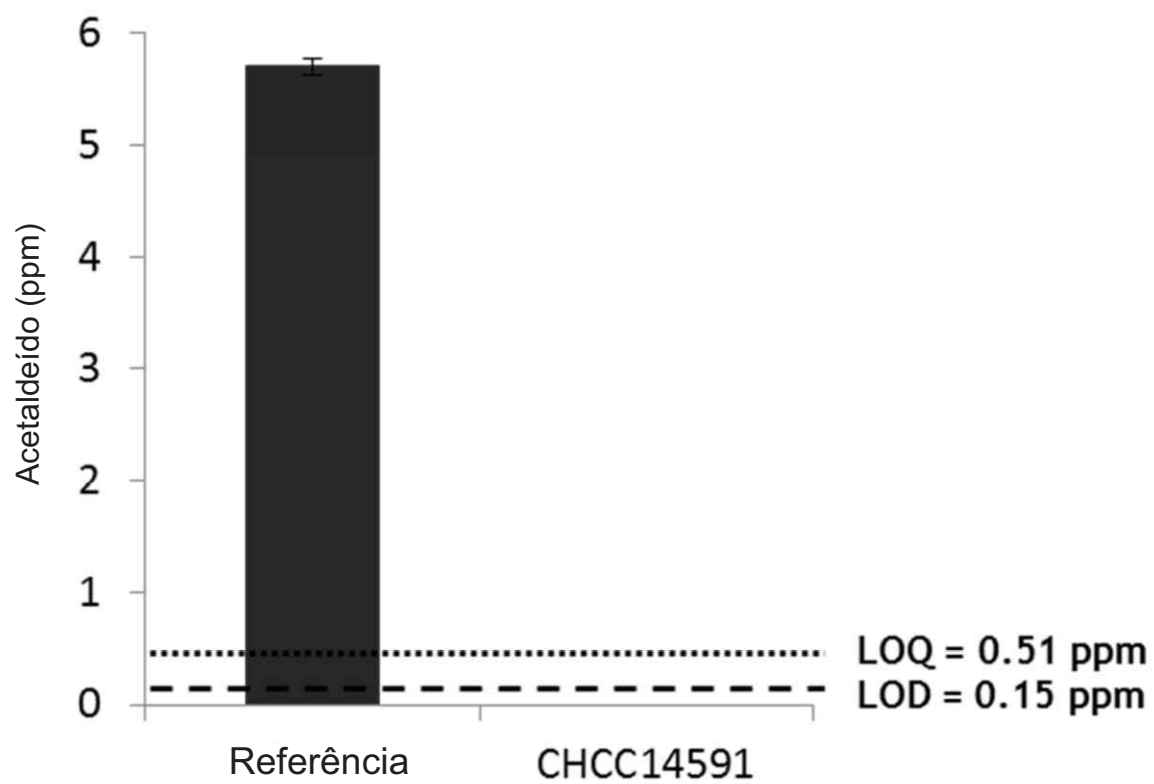


FIG. 13

FIG. 14

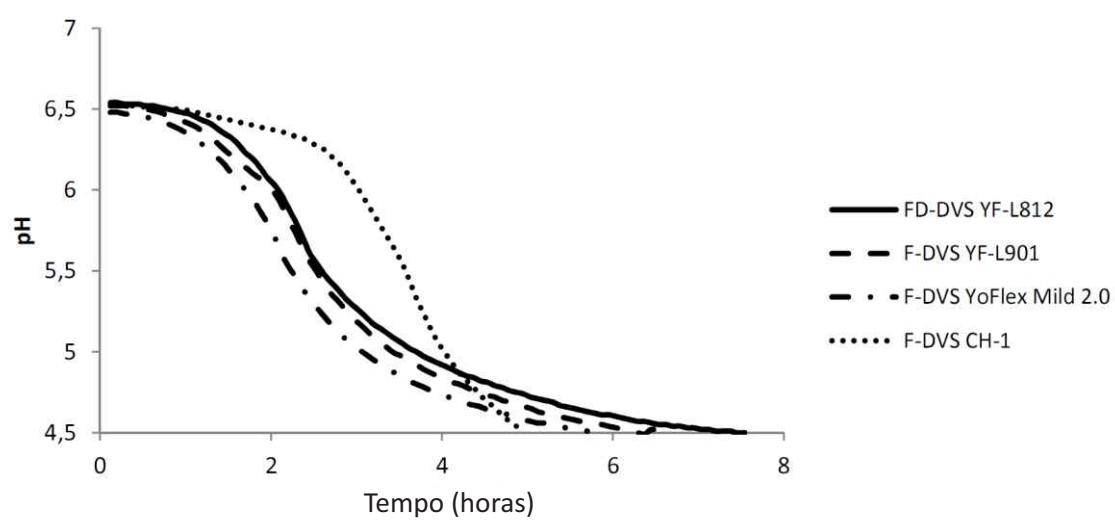


FIG. 15

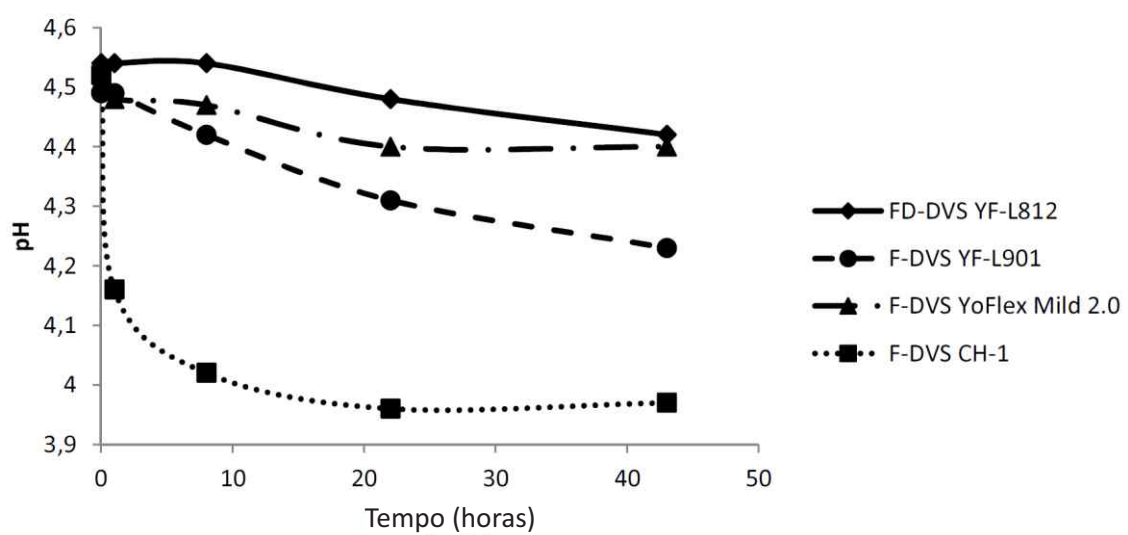


FIG. 16

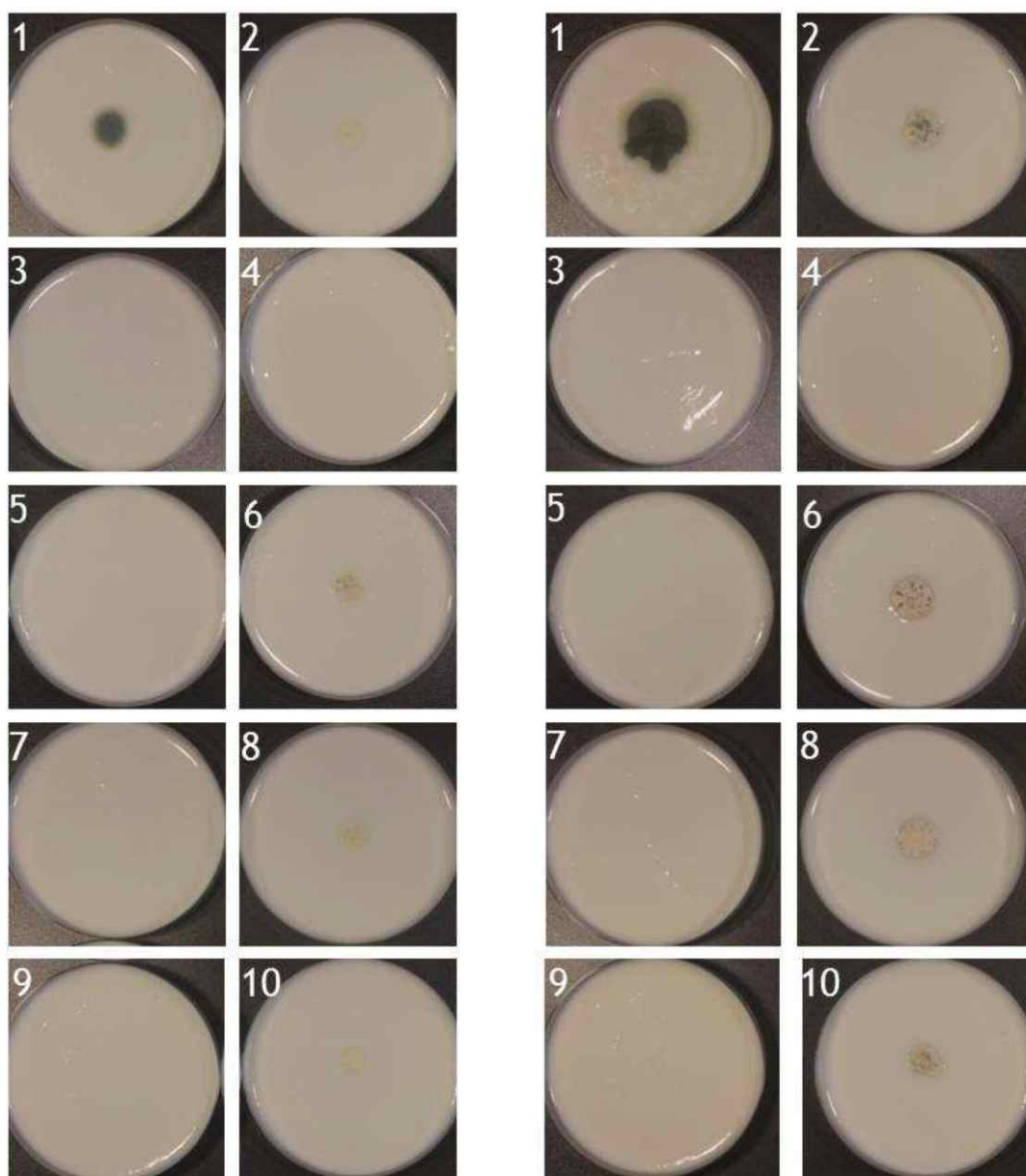


FIG. 17

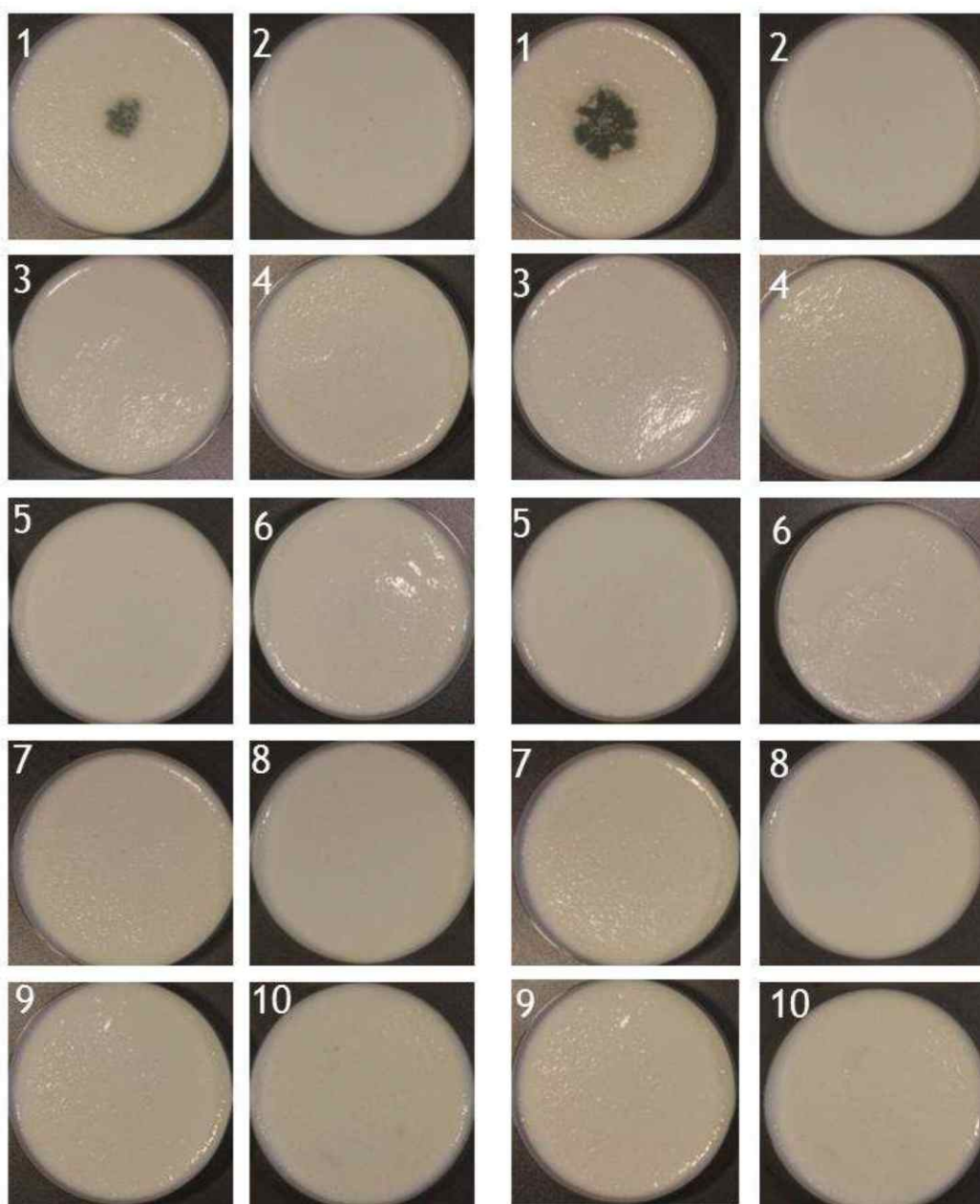


FIG. 18

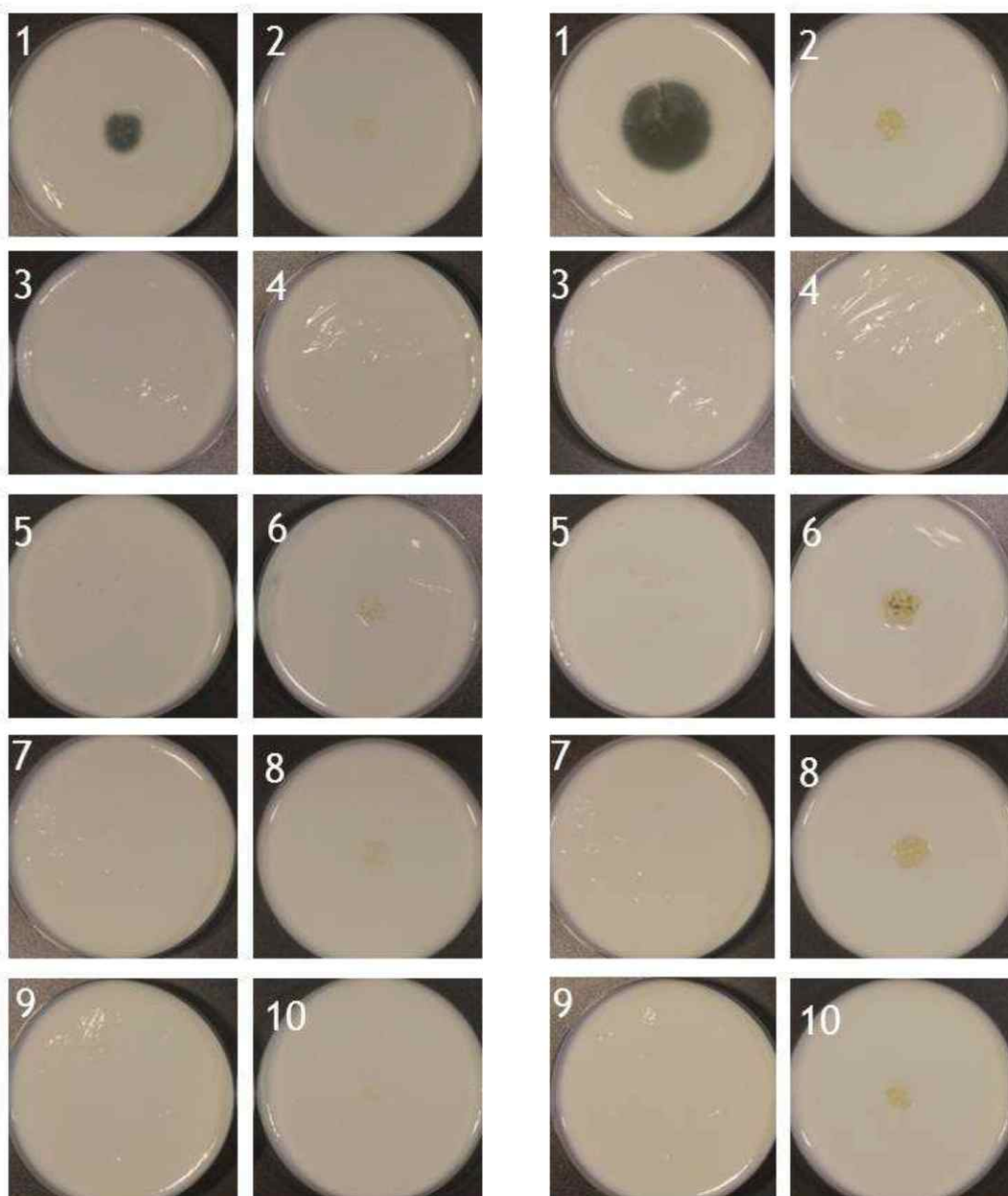


FIG. 19

