



21

Organización CSA Ltda

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

08-2395

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO _____ PRODUCTOS ALIMENTICIOS FERMENTADOS QUE

CONTIENEN CEPAS PROBIOTICAS Y SU PROCESO DE PREPARACION

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE _____ COMPAGNIE GERVAIS DANONE

DOMICILIO _____ PARIS, FRANCIA

74. APODERADO _____ EMILIO FERRERO

C.C. 438,019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PATENTE

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-002395- -00000-0000

Fecha: 2008-01-11 16:56:09

Dep. 2020 NUECREACIÓN

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 130

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT****ENTRADA EN FASE NACIONAL**

13 Feb. 2008

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.☐ Patente de Modelo de Utilidad.☒ Capítulo I.☐ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**Nombre: **COMPAGNIE GERVAIS DANONE**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Francia.Dirección: 17 Boulevard Haussmann,
F-75009,
París,
FranciaDomicilio: París,
Francia**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com.
Domicilio: Bogotá, Colombia.**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual _____

Número 438.019 T.P. 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

- Luc TERRAGNO**
22 rue de Rushmoor,
F-92190 Meudon,
Francia
- Philippe TESSIER**
12 sente des Chataigners,
F-91120 Palaiseau,
Francia
- Jean Michel FAURIE**
2 rue Lamartine,
F-78350 Jouy-en-Josas,
Francia

- François DEBRU**
12 rue Delly,
F-78000 Versailles,
Francia
- Stéphane HERVE**
Arturo Soria,
142 (3b),
E-28043 Madrid,
España

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/FR2006/001688Fecha: 11 de julio de 2006Publicación Internacional No. WO 2007/006970 A3Fecha: 18 de enero de 2007

6

Título (54)**PRODUCTOS ALIMENTICIOS FERMENTADOS QUE CONTIENEN CEPAS
PROBIÓTICAS Y SU PROCESO DE PREPARACION**

7

Clasificación Internacional (51) A23C 009/123

8

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐FR13 de julio de 20050507529

9

Comprobante de pago No.: 08-1.665**Fecha: 8 de enero de 2008**

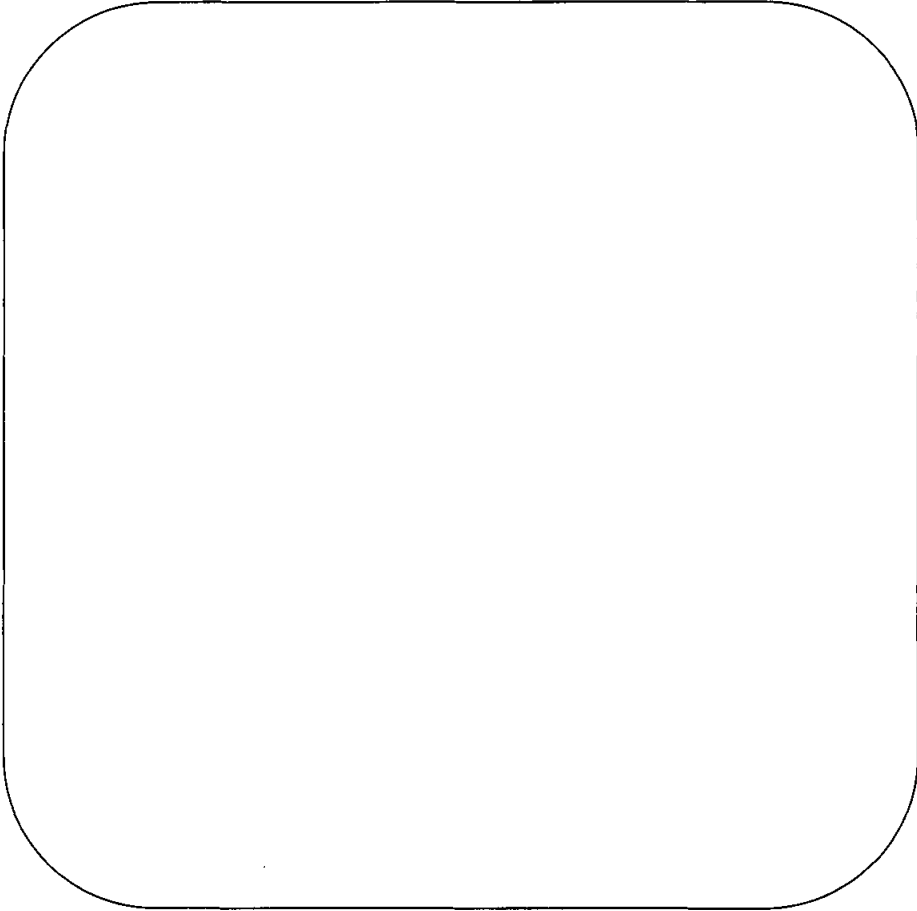
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 501.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS

11

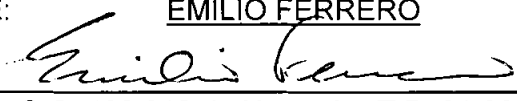
FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: EMILIO FERRERO

FIRMA: 
C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2007/006970 A3

Descripción:

Páginas 32 en el idioma original

Páginas 49 en español

Reivindicaciones: Número (s) 40

Figuras: Número (s) 4

2. ☒ **Forma PCT/ISA/210.** Informe de Búsqueda Internacional.

3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN LA FASE
INTERNACIONAL**

4

4561

CAVELIER
ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTA, 8 - COLOMBIA

184 Representación y poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica y de servicio, nombres comerciales, enseñanzas, derechos de autor, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation et Pouvoir avec authentication notariale et Apostille pour brevets, modèles d'utilité, dessins industriels; marques de fabrique, de service, noms commerciaux, enseignes, droits d'auteur, noms du domaine, slogans, licences.

REPRESENTACION Y PODER

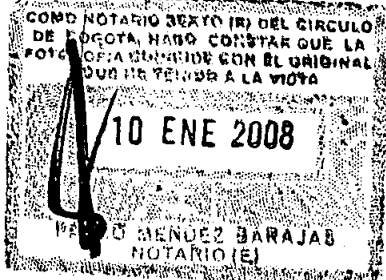
REPRESENTATION ET POUVOIR

Yo (nosotros), abajo firmado(s) / Je (nous) soussigné (s) COMPAGNIE GERVAIS DANONE

domiciliado (s) en/résidant (s) 17, Boulevard Haussmann, 75009 Paris, FRANCE

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y DANIEL PEÑA, tpa. 65.620, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

par cet instrument désigne (désignons) EMILIO FERRERO, tpa. 31929; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 et DANIEL PEÑA, tpa. 65.620, domiciliés à Bogota, Colombie, Carrera 4ª N° 72-35, conformément au paragraphe 1 de l'Article 543 du Code de Commerce, le premier comme principal et les autres comme suppléants, dans leur ordre, comme (mes) (nos) représentants dans toutes les affaires concernant la propriété industrielle ayant la faculté de recevoir les notifications et de nommer des mandataires judiciaires ou extrajudiciaires. Le premier représentant suppléant remplacera le principal en cas d'absence ou d'empêchement temporaire ou définitif de celui-ci. La même règle sera appliquée quand il faudra que le deuxième représentant suppléant remplace le premier, ou le troisième au deuxième. Dans ces cas, le représentant principal, ou le premier ou le deuxième suppléant dans leur cas, ou les deux, déclareront leur intention de ne pas exercer la représentation moyennant déclaration par devant Notaire Public en Colombie, ou par devant Notaire ou tout autre Fonctionnaire Public ou Consul de Colombie à l'étranger; et s'il s'agissait d'empêchement, avec le certificat respectif. Si l'un des nommés venait à manquer définitivement, le suivant prendrait sa place. Quand l'absence ou l'empêchement du représentant principal, ou de son premier ou second suppléant dans leur cas, aura cessé, ils pourront exercer leur représentation dans leur ordre, l'un ou les autres, suivant le cas, l'assumant par le seul fait de l'exercer, cessant à ce moment...là l'exercice de la représentation par le premier, deuxième ou troisième suppléant dans leur cas.



Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Obtención de registro de nuestros derechos de autor, actos o contratos y asuntos relativos a esos derechos c) Las acciones de competencia desleal, practicas comerciales restrictivas, promoción de la competencia, protección del consumidor, las acciones penales, oposición, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y p...os que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar y ratificar los actos de agentes oficiosos.

Par ailleurs j'octroie (nous octroyons) pouvoir aux avocats ci-avant mentionnés pour obtenir la protection de ma (notre) propriété industrielle et contre la concurrence déloyale; à cet effet, j'autorise (nous autorisons) lesdits fondés de pouvoir à me (nous) représenter devant toute entité ou personne, avec ou sans juridiction; notamment devant celles d'ordre administratif, contentieux-administratif et judiciaire, ainsi que devant les Tribunaux d'Arbitrage, pour tout ce qui concerne les affaires suivantes: a) l'obtention de brevets d'invention, de modèles d'utilité, de dessins industriels; le dépôt de marques de fabrique, collectives, défensives, de services, de slogans, de noms commerciaux, d'enseignes, noms du domaine, de variétés végétales et d'appellations d'origine; leur renouvellement, transfert, changement de nom ou de domicile, radiation volontaire, et l'enregistrement des contrats de licence; b) l'obtention de l'enregistrement des droits de auteur, actes et contrats ayant trait à ces droits; c) les actions de concurrence déloyale, pratiques anticoncurrentielles, de protection du consommateur, pénaux, d'opposition, de radiation administrative ou judiciaire, d'annulation, de contrefaçon, de licences, de tutelle, de protection des secrets industriels, et les procès civils, pénaux, administratifs ou contentieux-administratifs ayant trait à ces droits; les actions et les procès établis par moi (nous) ou contre moi (nous); et c) afin que pour toutes les questions mentionnées ci-dessus, ils puissent substituer ce pouvoir, transiger, concilier, admettre les faits du procès, se désister, annuler, recevoir, renoncer et ratifier les actes des agents officieux ou des personnes sans mandat.

Dado y firmado hoy /Signé le 19 septembre 2007

en/à Paris, France

Por/par M. Jérôme BUSCAIL

Firma

Signature

[Handwritten signature]

NOTAIRE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. République française

Le présent acte public

2. a été signé par *M. P. MONTAGNE*

3. agissant en qualité de *Notaire*

4. est revêtu du sceau/timbre de *[Signature]*

Je soussigné, M^e P. MONTAGNE
Notaire à PARIS (8^e)

38, Avenue Hoche

Certifie exacte la signature

ci-contre de

A Paris, le

Jérôme BUSCAIL
26 septembre 2007

Attesté

24 SEP. 2007

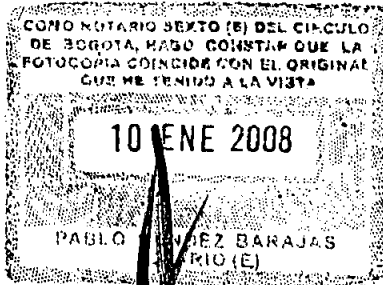
le Procureur général près la Cour d'appel de Paris

86666

TEPLIER

10. Signature:

© CAVILLER ABOGADOS
WPP0DE02184 (MINUTA 1211320)



CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infra-crito Notario Certifica: Que la firma que antecede de _____
es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de _____
de la compañía _____,
sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de _____,
que la dirección de dicha compañía es _____,
y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en _____

El _____

ATTESTATION NOTARIÉE (SOCIÉTÉS)

Je, soussigné Maître Notaire, certifie conforme la signature de Jérôme BUSCAIL.
Par ailleurs, je certifie également que la signataire exerce actuellement la fonction de Directeur Propriété Intellectuelle du COMPAGNIE GERVAIS DANONE

une société légalement constituée et existant selon les lois de France,

domiciliée 17, Boulevard Haussmann, 75009 Paris, France,

et que celui-ci est dûment autorisé à concéder le présent document.

Tous les faits précédemment mentionnés ont pu être corroborés au vu des documents dont j'ai pris personnellement connaissance et dont je fais foi.

Fait et signé à PARIS

le 24 September 2007

M^e Patrick MONTAGNE
NOTAIRE ASSOCIÉ
38, avenue Hoche
75008 PARIS

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Pays: _____
Le present acte public
2. a été signé par _____
3. agissant en qualité de _____
4. est revêtu du sceau/timbre de _____

1. République française

Le present acte public

2. a été signé par M^e MONTAGNE

3. agissant en qualité de Notaire

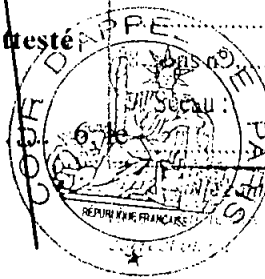
4. est revêtu du sceau/timbre de Paris

Attesté

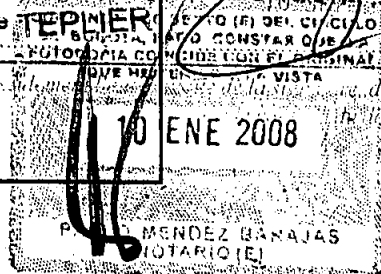
24 SEP. 2007

7. par le Procureur général près la Cour d'appel _____

Attesté



M^e TEPIER



TRADUCCIÓN OFICIAL NO. 891/2007-.

EL TEXTO QUE SIGUE ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN FRANCES. LLEVA LA FIRMA Y EL SELLO DE HELENA URIBE DE LEMOINE, TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL, SEGUN RESOLUCION NO. 3618 DEL MINISTERIO DE JUSTICIA DE COLOMBIA, DE FECHA 6 DE SEPTIEMBRE DE 1972.

TRADUCCION DE LOS SELLOS QUE SE ENCUENTRAN EN LA REPRESENTACION Y PODER OTORGADA POR **COMPAGNIE GERVAIS DANONE** DOMICILIADA EN 17 BOULEVARD HAUSSMANN, 75009 PARIS, FRANCIA, A LOS DOCTORES **EMILIO FERRERO, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Y DANIEL PEÑA.**

DADO Y FIRMADO EL 19 DE SEPTIEMBRE DE 2007, EN PARIS, FRANCIA
POR EL SEÑOR JEROME BUSCAIL.

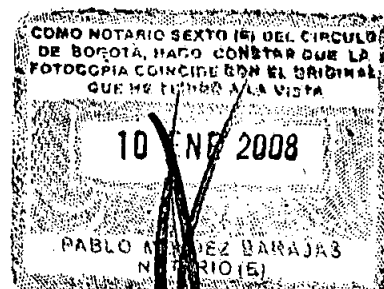
FIRMADO: ILEGIBLE.

EL SUSCRITO ABOGADO P. MONTAGNE, NOTARIO DE PARIS, CERTIFICA LA AUTENTICIDAD DE LA FIRMA DE JEROME BUSCAIL.

PARIS, 24 DE SEPTIEMBRE DE 2007.

FIRMADO: ILEGIBLE. HAY SELLO DEL NOTARIO.

[Handwritten signature]



APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

1. PAIS: REPUBLICA FRANCESA

EL PRESENTE DOCUMENTO PUBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: **ABOGADO MONTAGNE**
3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: NOTARIO
4. LLEVA EL SELLO DE: SU DESPACHO

CERTIFICADO

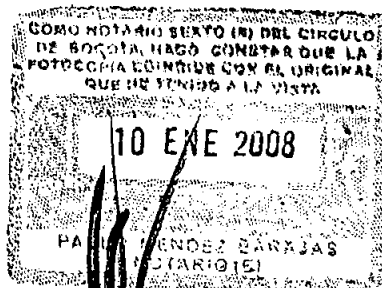
5. EN: PARIS
6. EL: 24 DE SEPTIEMBRE, 2007
7. POR: EL PROCURADOR GENERAL DE LA CORTE DE APELACIONES DE
PARIS
8. BAJO EL NO.: **86666**
9. SELLO: CORTE DE APELACIONES DE PARIS
10. FIRMADO: ILEGIBLE

La Apostilla confirma únicamente la autenticidad de la firma, del sello o de la estampilla del documento. No implica que el contenido del documento sea verdadero ni que la República Francesa apruebe su contenido

LA TRADUCTORA OFICIAL

Helena Uribe de Lemoine

HELENA URIBE DE LEMOINE

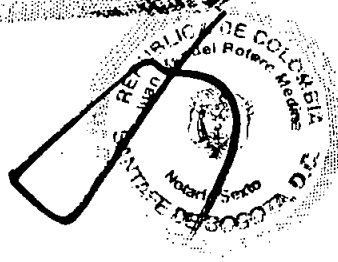


MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
2007 OCT -4
11:25

903580
Helena Uribe de Lemoine

RECEIVED
2007 OCT 4

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE
Helena Uribe de
Lemoine
COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA. 04 OCT 2007
CODEN JURS CIVIL



COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
10 ENE 2008
PABLO MENDOZA
NOTARIO

CERTIFICACION NOTARIAL
(SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: que la firma que antecede de **JEROME BUSCAIL**, es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de Apoderado de la **COMPAGNIE GERVAIS DANONE**, Sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de **FRANCIA**; que la dirección de dicha compañía es **17 bd Haussmann, 75009 Paris**; y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

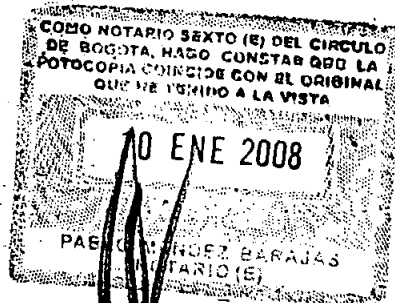
Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado: en París, el 24 de Septiembre de 2007

FIRMADO: PATRICK MONTAGNE, NOTARIO ASOCIADO.

HAY SELLO DEL NOTARIO.

Handwritten signature



APOSTILLA

CONVENIO DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961

1. PAIS: REPUBLICA FRANCESA

EL PRESENTE DOCUMENTO PUBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: **ABOGADO MONTAGNE**

3. ACTUANDO EN SU CAPACIDAD DE: NOTARIO

4. LLEVA EL SELLO DE: SU DESPACHO

CERTIFICADO

5. EN: PARIS

6. EL: 24 DE SEPTIEMBRE, 2007

7. POR: EL PROCURADOR GENERAL DE LA CORTE DE APELACIONES DE PARIS

8. BAJO EL NO.: **86666**

9. SELLO: CORTE DE APELACIONES DE PARIS

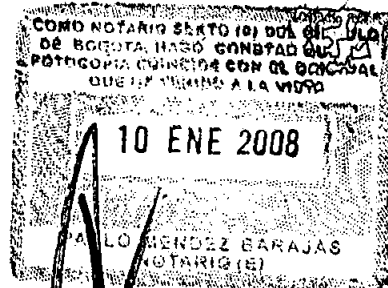
10. FIRMADO: ILEGIBLE

La Apostilla confirma únicamente la autenticidad de la firma, del sello o de la estampilla del documento. No implica que el contenido del documento sea verdadero ni que la República Francesa apruebe su contenido

LA TRADUCTORA OFICIAL

Helena Uribe de Lemoine

HELENA URIBE DE LEMOINE



MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES
2007 OCT - 29
A 11: 29

903593
Helena Uribe
c. u. l. e.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE

Helena Uribe de Lemoine

COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA

SANTAFE DE BOGOTA, 04 OCT 2007

 CODEX JURIS CRILIUS



COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FIRMA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

10 ENE 2008

FATIMEN MENDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
18 janvier 2007 (18.01.2007)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/006970 A3

(51) Classification internationale des brevets :

A23C 9/123 (2006.01) A23L 1/211 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01) A23B 7/10 (2006.01)
A23L 1/238 (2006.01) A23C 11/10 (2006.01)

(21) Numéro de la demande internationale :

PCT/FR2006/001688

(22) Date de dépôt international : 11 juillet 2006 (11.07.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :

0507529 13 juillet 2005 (13.07.2005) FR

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : **COMPAGNIE GERVAIS DANONE** [FR/FR]; 17, boulevard Haussmann, F-75009 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : **TER-RAGNO, Luc** [FR/FR]; 22, rue de Rushmoor, F-92190 Meudon (FR). **DEBRU, François** [FR/FR]; 12, rue Delly, F-78000 VERSAILLES (FR). **TESSIER, Philippe** [FR/FR]; 12, sente des Chataigners, F-91120 Palaiseau (FR). **HERVE, Stéphane** [FR/ES]; Arturo Soria, 142 (3b), E-28043 Madrid (ES). **FAURIE, Jean-Michel** [FR/FR]; 3, rue Lamartine, F-78350 Jouy-en-Josas (FR).

(74) Mandataires : **GROSSET-FOURNIER, Chantal, Catherine** etc.; Grosset-Fournier & Demachy Sari, 54, rue Saint-Lazare, F-75009 Paris (FR).

(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), curasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:

29 mars 2007

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: FERMENTED FOOD PRODUCTS CONTAINING PROBIOTIC STRAINS, AND METHOD FOR PREPARING SAME

(54) Titre : PRODUITS ALIMENTAIRES FERMENTES CONTENANT DES SOUCHES PROBIOTIQUES, ET LEUR PROCEDE DE PREPARATION

(57) Abstract: The invention mainly concerns the use of at least one sulphur-containing amino acid, at a total concentration of about 5 to 75 mg/ml, in particular of about 5 to about 50 mg/l, in particular of about 5 to about 30 mg/l, in particular of about 5 to about 20 mg/l, in free form, for implementing a method for preparing a fermented food product fermented by means of ferments containing bifidobacteria, said food product has acceptable sensory properties, contains more than about $5 \cdot 10^7$, in particular more than about 10^8 bifidobacteria per gram of food product fermented for a shelf lifetime of at least 30 days, in particular a shelf lifetime of at least 35 days, and containing no more than 0.5 % of yeast extract or of yeast autolysate.

(57) Abrégé : L'invention concerne principalement l'utilisation d'au moins un acide aminé soufré, à une concentration totale d'environ 5 à environ 75 mg/ml, en particulier d'environ 5 à environ 50 mg/l, en particulier d'environ 5 à environ 30 mg/l, en particulier d'environ 5 à environ 20 mg/l, sous forme libre, pour la mise en œuvre d'un procédé de préparation d'un produit alimentaire fermenté à l'aide de ferments contenant des bifidobactéries, lequel produit alimentaire fermenté présente des propriétés organoleptiques acceptables, contient plus d'environ $5 \cdot 10^7$, en particulier plus d'environ 10^8 bifidobactéries par gramme de produit alimentaire fermenté pendant une période de conservation d'au moins 30 jours, en particulier d'au moins 35 jours, et ne contient pas plus de 0,5 % d'extrait de levure ou d'autolysat de levure.

WO 2007/006970 A3

**FERMENTED FOOD PRODUCTS CONTAINING PROBIOTIC
STRAINS AND THEIR PREPARATION PROCESS**

5 The invention relates to fermented food products containing probiotic strains, and
their preparation process.

 The bifidobacteria belong to the dominant anaerobic flora in the colon. The main
species present in the human colon are *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium*
bifidum, *Bifidobacterium longum ssp infantis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium*
longum.

10 The bifidobacteria are probiotic bacteria of choice. Bacteria of the genus
Bifidobacterium are used in numerous products currently on the market and are often
added to dairy products already comprising the standard bacteria in yogurt (*Streptococcus*
thermophilus and *Lactobacillus bulgaricus*).

15 The consumption of bifidobacteria is recognized as being beneficial in the process
of re-establishing the normal bifidobacteria population in individuals having undergone
antibiotics therapy. This consumption also seems to make it possible to reduce
constipation, prevent diarrhoea and reduce the symptoms of lactose intolerance.

 Probiotics are live bacteria. The use of these live bacteria in the manufacture of
food products such as dairy products is tricky in particular with regard to the problem of
20 survival of these bacteria in the product.

 80% of the products currently on the market which contain bifidobacteria do not
satisfy the criteria making it possible to maintain that they significantly improve the
intestinal transit of the individuals consuming them. A daily intake of at least 10⁸ to 10⁹
viable cells has been recommended as the minimum dose making it possible to have a
25 therapeutic effect (Silva A.M., Barbosa F. H., Duarte R., Vieira L. Q., Arantes R. M.,
Nicoli J. R., Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis
in mice, J. Appl. Microbiol. 97 (2004) 29-37). The required dose can be dependent on the
probiotic strain used.

30 In the case of the production of a bioactive food product containing bifidobacteria
the problem therefore arises of obtaining a sufficient population of these bacteria in the
product and maintaining it during the "life" of the product without resorting to technical
solutions capable of altering the organoleptic qualities of the product.

The problem of the numerical size of the population of probiotic strains in a fermented dairy product is a known problem (see in particular D. Roy, Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products, Lait 85 (2005) 39-56, INRA, EDP Sciences).

5 Several reasons for this problem have been suggested, including the reduction in the population during storage, the disturbed growth of these bacteria starting from a certain pH or quite simply the poor ability of these bifidobacteria to grow, in particular in milk.

10 It is known that the fructo-oligosaccharides, certain starches, certain sugars, glycerol and certain yeast extracts have significant bifidogenic effects. On the other hand oxygen is toxic to certain probiotic strains.

The use of cysteine or ascorbate as an oxygen scavenger has therefore been described (A review of oxygen toxicity in probiotic yogurts: influence on the survival of probiotic bacteria and protective techniques. Talwalkar & Kailasapathy; Comprehensive
15 Reviews in Food Science and Food Safety, 3 (3) 117-124; 2004), without it however having been demonstrated that the use of these substances makes it possible to obtain and maintain populations of bifidobacteria at the desired levels during storage. Moreover, the potentially negative effect of the cysteine on the final properties of a yogurt has been noted.

20 Generally, the fermented food products having properties of relative maintenance of the populations of bifidobacteria during the preservation of said products, and which are described in the literature, do not generally have acceptable organoleptic properties, due to the fact in particular that substances such as yeast extract are present in a high concentration in the products.

25 The main purpose of the invention is to provide fermented food products having acceptable organoleptic properties and containing a high concentration of bifidobacteria at the end of the fermentation period and throughout the preservation period of said fermented food products.

30 The main purpose of the invention is to provide fermented food products containing bifidobacteria in a good physiological state and having a significant survival rate during the period of preservation of said fermented food products, in particular up to the use-by date of the products.

Another purpose of the invention is to provide preparation processes which are simple to implement, making it possible to obtain the above products.

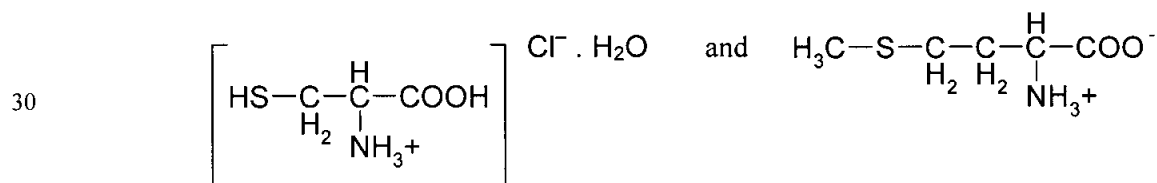
Another purpose of the invention is to promote the growth of the bifidobacteria in relation to the standard symbioses present in yogurts, these symbioses being constituted in a standard fashion by one or more strains of *Streptococcus thermophilus* and of *Lactobacillus bulgaricus*.

5 The purposes of the invention are achieved thanks to the surprising finding made by the inventors that the incorporation of sulphur-containing amino acids in the starting substance during the preparation of fermented food products containing bifidobacteria, in a small enough quantity not to alter the organoleptic properties of the products, makes it possible to obtain rapidly, after fermentation of the populations, at least 5.10^7 or even 10^8
10 bifidobacteria per gram of product, and increased survival of the bifidobacteria up to the use-by date of the products, without necessarily modifying the growth of the other bacterial strains.

The invention relates to the use of at least one sulphur-containing amino acid, at a total concentration of approximately 5 to approximately 75 mg/l, in particular
15 approximately 5 to approximately 50 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 30 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 20 mg/l in the free form, for the implementation of a process for the preparation of a fermented food product using ferments containing bifidobacteria, which fermented food product has acceptable organoleptic properties, contains more than approximately 5.10^7 , in particular more than
20 approximately 10^8 bifidobacteria per gram of fermented food product for a preservation period of at least 30 days, in particular at least 35 days and does not contain more than 0.5% of yeast extract or yeast autolysate.

By "sulphur-containing amino acid" is meant cysteine (L-cysteine) or methionine as well as their derivatives, optionally in the form of a salt.

25 In particular there can be used according to the invention monohydrated L-cysteine hydrochloride (monohydrated (R)-2-amino-mercaptopropionic acid monohydrochloride) or L-methionine ((S)-2-amino-4-methylthio-butyric acid), of the respective formulae:



By "in the free form" is meant amino acids which are not bound to other amino acids by a peptide bond within peptides, polypeptides or proteins.

15

Preferably, the sulphur-containing amino acids according to the invention are used in reduced form, i.e. the sulphhydryl group $-SH$ is reduced. This preferred form of the sulphur-containing amino acids therefore excludes in particular cystine, the oxidized form of cysteine involving the combination of two cysteines via a disulphide bridge.

5 The bifidobacteria being substantially without proteolytic activity, it is advantageous to use the abovementioned amino acids in the free form so that they can be directly assimilated by the bifidobacteria.

The sulphur-containing amino acid or acids used according to the invention are advantageously filtered beforehand and / or autoclaved (or pasteurized, i.e. treated at a
10 temperature above $50^{\circ}C$) and / or irradiated, in order to take account of the constraints of use as regards microbiological contamination, i.e. so that they are substantially without microbial contaminants.

If the sulphur-containing amino acids are used at a concentration above 75 mg/l, a degradation of the organoleptic properties of the food product is noted.

15 If the sulphur-containing amino acids are used at a concentration below 5 mg/l, the population of bifidobacteria greater than $5 \cdot 10^7$ or 10^8 CFU per gram of product cannot generally be maintained during the preservation period of the product.

It should be noted that the concentration of sulphur-containing amino acids used according to the invention relates to the sulphur-containing amino acid or acids especially
20 added during the preparation of the products. This concentration does not take account of the possible bacterial production of sulphur-containing amino acids during the preparation nor even of the quantity of sulphur-containing amino acids in the free form which are naturally present in the starting substance which serves to prepare the food product (for example in milk) or in the adjuvants which can be used during the
25 preparation.

The typical concentration of sulphur-containing amino acids present in milk is 100 to 1300 mg/l including approximately 260 mg/l cysteine and 1020 mg/l methionine (Handbook of Milk composition, 1995, Academic Press). It should be noted that the vast
30 majority of these sulphur-containing amino acids present in milk is in the bound form in peptide or protein chains.

By "ferments" is meant a set of bacteria, in particular bacteria intended for fermentation and / or bacteria with probiotic value.

By “acceptable organoleptic properties” is meant in particular the absence of an undesirable sulphur-type taste, as determined by a standard sensory analysis test, which can correspond to the protocol described hereafter.

5 The sensory mechanism starts with the generation of a stimulus following the consumption of a product. This stimulus allows a perception which is dependent on genetic and physiological factors in the individual consumer. This perception is then verbalized (a list of words is proposed to the consumer) then quantified (use of ranges). The consumer then gives an overall assessment of the product that he has consumed (this assessment is influenced by his culture, his experiences) and says whether or not he
10 would be prepared to buy this product (data such as cost, communication about this product can then be provided).

Sensory analysis is a science based on perception (physiological and psychological) involving the five senses (taste, smell, sight, hearing, touch) and using very rigorous protocols.

15 The consumers constituting the panel who carry out the sensory analyses are selected for their sensory abilities, their abilities in terms of verbalization, their abilities in terms of use of ranges for an assessment and their abilities to work in a group (in order to obtain a consensus). It is absolutely necessary to verify that the assessments of the panel members are repeatable, reproducible, with a homogeneity in terms of discrimination and
20 in terms of classification. Tests making it possible to verify these pre-requisites are repeated several times. The choice of products is made according to three main criteria: according to the age of the product (products of the same age are chosen), these products must be representatives in the case of a standard assessment and the products are homogeneous (few differences between them). These products are presented
25 anonymously and in coded form, in a certain order and homogeneously (same temperature etc.).

The environmental conditions of the sensory analysis are important: the conditioned air, the lighting, the sound environment, the decoration (neutral if possible) and the odour of the room in which the analysis is carried out should be standardized. The panel
30 members are separated by cubicles. They should not smoke, consume coffee or menthol in the hours preceding the analysis session. They should also not wear perfume or make-up.

17

At the end of this analysis, a product is to be considered as having "acceptable organoleptic properties" if the panel members have not detected an undesired sulphur-type taste in this product.

5 The preservation or storage period of the fermented food product is the period which immediately follows the end of the process of preparation of the fermented food product and its packaging. During this preservation period the fermented food product is usually preserved at a temperature comprised between approximately 4 and approximately 10°C.

10 The abovementioned fermented food product contains more than $5 \cdot 10^7$, in particular more than 10^8 bifidobacteria per gram of fermented food product in particular for a preservation period of at least 40 days. More particularly the abovementioned fermented food product contains more than $5 \cdot 10^7$, in particular more than 10^8 bifidobacteria per gram of fermented food product up to the use-by date of the product.

15 The use-by dates depend on the legal preservation periods fixed by current legislation, which can typically vary from 15 to 50 days from the date of production. By way of example, the legal preservation period is generally 30 days for fresh dairy products.

20 A population of bifidobacteria which is greater than or equal to 10^8 CFU/g at the use-by date of product preserved between 4 and 10°C can be considered a sufficient population of bifidobacteria given the medical recommendations relating to the provision of bifidobacteria in food.

25 By "does not contain more than 0.5% of yeast extract or yeast autolysate", is meant in particular that the abovementioned fermented food product does not contain more than 0.5% of yeast extract or yeast autolysate at the end of its preparation process and / or that the abovementioned fermented food product does not contain more than 0.5% of yeast extract or yeast autolysate for the preservation period of at least 30 days, in particular at least 35 days, in particular at least 40 days or up to the use-by date of the abovementioned fermented food product. Moreover, the abovementioned fermented food product no longer contains a quantity greater than 0.5% of yeast extract or yeast autolysate during
30 the process for the preparation of the product, and in particular at the time of the inoculation of the bacteria and throughout the fermentation.

By "yeast extract" and "yeast autolysate" is meant concentrates of soluble compounds of yeast cells. In this regard reference may be made in particular to the article

“Yeast extracts: production, properties and components” by Rolf Sommer (9th International Symposium on Yeasts), from which the information below is extracted.

Yeast extracts are mainly produced by autolysis, i.e. cell hydrolysis is carried out without the addition of other enzymes. The yeast extract or yeast autolysate are used mainly in the fermentation industry and in the agri-food industry. The main raw material used in order to produce the yeast extract is constituted by yeasts with a high concentration of proteins (strains of *Saccharomyces cerevisiae*) cultured on media based on molasses or is constituted by yeasts from debittered beer (strains of *Saccharomyces cerevisiae* or *Saccharomyces uvarum*). Other raw materials used are yeasts such as *Kluyveromyces fragilis* (fermented on lactoserum) or *Candida utilis* (cultured on carbohydrate-rich waste originating from of the timber industry or on ethanol) or also special strains of baker’s yeasts, in order to produce yeast extract containing 5’-nucleotides.

Autolysis is the dissociation process most frequently used in the production of yeast extract. During this process, the yeasts are degraded by their own endogenous enzymes. The autolysis process can be initiated by an osmotic shock or controlled temperature, causing cell death without inactivating the endogenous enzymes (in particular the proteases). A controlled pH, the temperature and the duration of the autolysis are decisive factors in a standardized autolysis process. By adding salts or enzymes (for example proteases or mixtures of proteases and peptidases) relative to the “standard” autolysis, the protein degradation of the yeast cells can be controlled.

Besides autolysis, the yeast extract can be produced by thermolysis (for example by boiling the yeasts in water at 100°C), plasmolysis (treatment with strong saline solutions at a temperature below 100°C) and mechanical degradation (high-pressure homogenization or grinding).

Then the soluble compounds are separated from the insoluble cell walls and concentrated with an evaporator with stirring or falling film evaporator, followed by optional stages of filtration, concentration under partial vacuum and rapid sterilization. Three types of yeast extract exist: liquid yeast extract (dried matter: 50 to 65%); viscous paste-type yeast extract (dried matter: 70 to 80%); dry yeast extract powder.

Taking the example of a standard yeast extract powder used in the fermentation industry, the composition is the following:

Protein content:	73-75%
Sodium:	less than 0.5%

Polysaccharides:	less than 5%
Oligosaccharides:	less than 1%
Lipids:	less than 0.5%

The protein content is typically distributed as follows:

5	Free amino acids:	35-40%
	Di, tri and tetrapeptides (MW < 600 Da):	10-15%
	Oligopeptides (MW of 2000-3000 Da):	40-45%
	Oligopeptides (MW of 3000-100000 Da):	2-5%

10 The typical cysteine content is 0.45%, and the typical methionine content is 1.12% (1.08% in the free form).

The invention relates to the use of at least one sulphur-containing amino acid, at a total concentration of approximately 5 to approximately 30 mg/l, in particular approximately 10 to approximately 15 mg/l, in particular approximately 12 to approximately 15 mg/l, and in particular 12.5 mg/l, in the free form, for the
15 implementation of a process for the preparation of a fermented food product using ferments containing bifidobacteria, which fermented food product has acceptable organoleptic properties, contains more than approximately $5 \cdot 10^7$, in particular more than approximately 10^8 bifidobacteria per gram of fermented food product for a preservation period of at least 30 days, in particular at least 35 days and does not contain more than
20 0.5% yeast extract or yeast autolysate.

Moreover, the invention also relates to a fermented food product, having acceptable organoleptic properties, containing ferments comprising more than approximately $5 \cdot 10^7$, in particular more than approximately 10^8 bifidobacteria per gram of fermented food product for a preservation period of at least 30 days, in particular at least 35 days and
25 having a total concentration of sulphur-containing amino acids in the free form of approximately 5 to approximately 50 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 30 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 20 mg/l, in particular approximately 10 to approximately 15 mg/l, in particular approximately 12 to approximately 15 mg/l, and in particular 12.5 mg/l.

30 More particularly, said fermented food product contains ferments comprising more than approximately $5 \cdot 10^7$, in particular more than approximately 10^8 bifidobacteria per gram of fermented food product for a preservation period of at least 40 days or up to the use-by date of the fermented food product.

Advantageously, the fermented food product as defined above is such that the ratio of the number of bifidobacteria contained in the fermented food product at the end of the preservation period to the number of bifidobacteria contained in the fermented food product at the start of the preservation period of at least 30 days, in particular at least 35 days, is approximately 0.2 to approximately 0.8, in particular approximately 0.3 to approximately 0.7, in particular approximately 0.4 to approximately 0.5.

In other words the survival rate of the bifidobacteria contained in the fermented food product between the start of the preservation period (i.e. the end of the preparation process) and the end of the preservation period is comprised between 20 and 80%, in particular between 30 and 70%, and in particular between 40 and 50%.

Said preservation period is at least 30 days, in particular at least 35 days, but more particularly at least 40 days or extends at least up to the use-by date of the fermented food product.

The invention also relates to a fermented food product preserved for a preservation period of at least 30 days, in particular at least 35 days, at a temperature of approximately 4 to approximately 10°C, having acceptable organoleptic properties and containing ferments comprising more than approximately $5 \cdot 10^7$, in particular more than approximately 10^8 bifidobacteria per gram of fermented food product.

More particularly the invention relates to a fermented food product preserved for a preservation period of at least 30 days, in particular at least 35 days, in particular at least 40 days, at a temperature of less than 12°C or less than 10°C, having acceptable organoleptic properties and containing ferments comprising more than approximately $5 \cdot 10^7$, in particular more than approximately 10^8 bifidobacteria per gram of fermented food product.

Preferably, the invention relates to a fermented food product as defined above containing approximately 5 to approximately 50 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 30 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 20 mg/l, in particular approximately 10 to approximately 15 mg/l, in particular approximately 12 to approximately 15 mg/l, and in particular 12.5 mg/l, of sulphur-containing amino acids and in particular approximately 5 to approximately 50 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 30 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 20 mg/l, in particular approximately 10 to approximately 15 mg/l, in particular approximately 12 to approximately 15 mg/l, and in particular 12.5 mg/l of cysteine and / or approximately 5 to

approximately 30 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 15 mg/l, of methionine.

In order to determine the cysteine, it is possible to use an amino acid analyzer such as the L-8800 High Speed Amino Acid Analyzer (Hitachi High Technologies). This analyzer combines ion-exchange chromatography with colorimetric detection at two wavelengths (570 and 440 nm) after reaction with ninhydrin. It is also possible to use gas chromatography coupled with mass spectrometry or high-performance liquid chromatography coupled with fluorimetric detection.

The more particular use of cysteine is advantageous as it gives rise experimentally to a better bifidogenic effect than methionine.

The more particular use of methionine is advantageous as its cost is lower than that of the use of the cysteine.

Advantageously, said fermented food product contains less than approximately 0.5% (w/w) of substances containing more than approximately 1.7% of sulphur-containing free amino acids.

More particularly said fermented food product contains less than approximately 0.5% (w/w) of yeast extract and / or yeast autolysate and / or milk, plant or soya protein hydrolysate.

The possible presence of yeast extract or yeast autolysate type substances is easily detectable in the product by known methods. In particular, the glucans or the mannans provided by these substances are detectable. For example, the glucans and mannans being fibres, it is possible to use the total dietary fibre determination method, recommended by the AFSSA [French Agency for Food Safety] (method AOAC 985.29). The addition of yeast extract or a similar substance must also result in a complete modification of the content of all of the 20 amino acids in the product, as well as in a modification of the concentration of vitamins and minerals, relative to the normal composition of the product (for the example of milk, reference may in particular be made to the Handbook of milk composition, 1995, Academic Press).

According to a preferred embodiment, the bifidobacteria contained in the fermented food product as defined above are of the type *Bifidobacterium animalis*, in particular *Bifidobacterium animalis animalis* and / or *Bifidobacterium animalis lactis*, and / or *Bifidobacterium breve* and / or *Bifidobacterium longum* and / or *Bifidobacterium infantis* and / or *Bifidobacterium bifidum*.

Advantageously, the fermented food product as defined above is based on plant juice and in particular fruit juice or vegetable juice such as soya juice, or on a dairy product, and in particular on cow's milk and / or on goat's milk.

5 Said fermented food product can also be based on sheep's milk, camel's milk or mare's milk.

By plant juice is meant a juice produced from plant extracts, in particular soya, tonyu, oat, wheat, maize etc.

Examples of vegetable juice are: tomato juice, beet juice, carrot juice etc.

10 Examples of fruit juice are: apple, orange, strawberry, peach, apricot, plum, raspberry, blackberry, gooseberry, pineapple, lemon, citrus fruit, grapefruit, banana, kiwi fruit, pear, cherry, passion fruit, mango, exotic fruit juice, multifruit juice etc.

According to a preferred embodiment, the ferments of the fermented food product as defined above contain lactic bacteria, in particular one or more bacteria of the genus *Lactobacillus spp.* and in particular *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* and / or *Lactobacillus casei* and / or *Lactobacillus reuteri* and / or *Lactobacillus acidophilus* and / or *Lactobacillus helveticus* and / or *Lactobacillus plantarum*, and / or bacteria of the type *Lactococcus cremoris* and / or *Streptococcus thermophilus* and / or *Lactococcus lactis* and / or one or more bacteria of the genus *Leuconostoc*.

20 Advantageously, the fermented food product as defined above is such that the proportion of bifidobacteria in the ferments is approximately 20 to approximately 80%, in particular approximately 30 to approximately 70%, in particular approximately 40 to approximately 60%, and in particular approximately 50%.

25 By "proportion of bifidobacteria in the ferments" is meant the proportion of bifidobacteria relative to the total number of bacteria included in the fermented food product, i.e. relative to all of the bifidobacteria and other bacteria, in particular the bacteria *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* etc.

30 The good numerical balance between the bifidobacteria and the other bacterial strains in the fermented food product at the end of the preparation process, and the substantial maintenance of this balance throughout the preservation period, are essential guarantees of the quality of the food product.

A proportion of 50% bifidobacteria constitutes a good compromise between the problem of cost (the bifidobacteria are expensive) and the problem of obtaining a correct population of bifidobacteria.

5 According to a preferred embodiment, the fermented food product as defined above is presented in the form of a stirred fermented food product or a fermented food product for drinking or a firm fermented food product or an infant fermented food product.

By "stirred [...] product" is meant a product, in particular a milk, seeded, fermented, mechanically stirred then packaged. The fermentation of such a product is carried out not in a pot but in bulk, in tanks. The curd is stirred then cooled down before
10 being packed in pots, which are stored under refrigeration. By curd is meant a coagulate of proteins in particular of milk.

By "[...] product for drinking" is meant a product in substantially liquid form. A product for drinking is a product which is such that, after the mechanical stirring stage, the product is beaten in the tanks before being packaged.

15 By "firm [...] product" is meant a product (in particular a milk) seeded and directly packaged in pots where it ferments. After the seeding, the product is packaged in pots. These pots are generally placed in an oven for 3 hours. The bacteria reproduce and consume the lactose which is then partially converted to lactic acid which modifies the structure of the proteins, forming what is known as a "lactic gel". Then, the products are
20 placed in a ventilated cooler or cooling tunnel and stored at approximately 2-4°C.

By "infant [...] product" is meant a product suited to an infant's needs, with a low protein and fat content.

Said fermented food product can in particular be a yogurt or a firm, stirred or drinking yogurt or a bar containing a dairy substance, kefir, a biscuit with a dairy filling,
25 a water containing probiotics etc

Moreover the invention also relates to a process for the preparation of a fermented food product from a starting substance, comprising

- a stage of seeding a starting substance, optionally pasteurized, by inoculation with seeding ferments containing bifidobacteria, in order to obtain a seeded
30 substance,
- a stage of fermentation of the seeded substance obtained in the preceding stage in order to obtain a fermented substance,
- a stage of incorporation of at least one sulphur-containing amino acid in the free form at a concentration of approximately 5 to approximately 75 mg/l in

particular approximately 5 to approximately 50 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 30 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 20 mg/l, in particular approximately 10 to approximately 15 mg/l, in particular approximately 12 to approximately 15 mg/l, and in particular 12.5 mg/l, this stage of incorporation being able to occur

- either before the seeding stage,
- or substantially simultaneously with the seeding stage,
- or after the seeding stage and before the fermentation stage,

providing that the fermented food product does not contain more than 0.5% (w/w) of yeast extract and / or yeast autolysate.

By "fermentation" is meant a biochemical reaction which involves releasing energy from an organic substrate, under the action of micro-organisms. It is a conversion process of a raw material by the micro-organisms, this conversion then producing biomass and metabolites. In particular, lactic fermentation is an anaerobic process of the consumption of lactose by the bacteria in the ferments, which causes the formation of lactic acid and a lowering of the pH.

The invention follows from the surprising finding made by the inventors that the incorporation of sulphur-containing amino acids within the abovementioned ranges, in the absence of yeast extract and / or yeast autolysate or in the presence of a low concentration of the latter, makes it possible to improve the resistance of the bifidobacteria and their ability to survive. The bifidobacteria contained in the fermented food product at the end of the preparation process of the invention are in a better physiological state than if the stage of incorporation of sulphur-containing amino acids were omitted, which allows a larger number of these bifidobacteria to survive during the preservation of the fermented food product which follows.

Cysteine and / or methionine therefore have a specific bifidogenic effect. On the other hand the use of yeast extract and / or yeast autolysate, in particular at concentrations greater than 0.5% (w/w), has a tendency to stimulate all of the bacteria contained in the fermented food product, which can lead to an imbalance in the bacterial symbiosis to the detriment of the bifidobacteria, and in favour in particular, if they are present, of the lactic bacteria. The consequences of this imbalance are a modification of the pH, a production of acetic acid and / or of H_2O_2 , all events which are detrimental to the quality of the product.

Moreover it should be noted that from a concentration of sulphur-containing amino acids greater than 30 mg/l, in particular from a concentration of sulphur-containing amino acids greater than 50 mg/l, and more particularly from a concentration of sulphur-containing amino acids greater than 75 mg/l, a clear degradation of the organoleptic properties of the food products is noted. This degradation is noted by means of a standard taste test as described above, which reveals the existence of a sulphur taste capable of making the products unsuitable for consumption and marketing. It should be noted that the disagreeable sulphur taste occurs in particular in the case of incorporation of cysteine and / or of methionine at more than 75 mg/l, or even in certain cases at more than 50 or 30 mg/l, but also when the concentrations of sulphur-containing amino acids exceed such values due to the presence of additional substances, for example yeast extract or yeast autolysate, in particular at a level of more than 0.5% (w/w).

Another important characteristic of the process of the invention is that the incorporation of the ferments containing the bifidobacteria is done directly into the starting substance intended to become the fermented food product, without necessarily resorting to artificial / synthetic intermediate growth media.

According to a particular embodiment, the process as defined above does not comprise a stage of addition of additional substances containing one or more sulphur-containing amino acids.

According to another particular embodiment, the process as defined above comprises a stage of addition of additional substances containing one or more sulphur-containing amino acids in the free form, the concentration of sulphur-containing amino acids in the free form in the additional substances being less than approximately 1.7%, preferably less than approximately 0.5%, and the concentration of said additional substances in the fermented food product being less than approximately 0.5%.

More particularly, said stage of addition of additional substances can involve addition of a yeast extract and / or yeast autolysate and / or milk, plant or soya protein hydolysate at a concentration of less than approximately 0.5% (w/w).

Preferably, this stage of addition of additional substances takes place before the fermentation stage, for example substantially simultaneously with the seeding stage and / or simultaneously with the stage of incorporation of at least one sulphur-containing amino acid.

The benefit of an addition substantially simultaneously with the seeding stage and / or simultaneously with the stage of incorporation of at least one sulphur-containing

amino acid is of a practical nature. In this case, the additional yeast extract type substances are at least partially degraded during fermentation, as they serve to supply nutrients to the ferments. Thus the concentration of the additional yeast extract type substances varies during the fermentation.

5 Advantageously, the process for the preparation of a fermented food product as defined above also comprises a pasteurization stage taking place before the seeding stage, making it possible to obtain a pasteurized starting substance from the starting substance.

 By "pasteurization" is meant the method usual in the field of food preservation involving a rapid heating without boiling, followed by rapid cooling, making it possible
10 to destroy most of the bacteria while partially preserving the proteins.

 According to a particular embodiment, the stage of incorporation of at least one sulphur-containing amino acid takes place before the pasteurization stage, the sulphur-containing amino acid or acids being incorporated at a concentration of approximately 5 to approximately 75 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 30 mg/l, in
15 particular approximately 10 to approximately 15 mg/l, in particular approximately 12 to approximately 15 mg/l, and in particular 12.5 mg/l.

 The benefit of incorporation before the pasteurization stage is of a practical nature.

 According to another particular embodiment, the stage of incorporation of at least one sulphur-containing amino acid takes place substantially simultaneously with the
20 seeding stage, the sulphur-containing amino acid or acids being incorporated at a concentration of approximately 5 to approximately 50 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 30 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 20 mg/l, in particular approximately 10 to approximately 15 mg/l, in particular approximately 12 to approximately 15 mg/l, and in particular 12.5 mg/l.

25 The benefit of incorporation substantially simultaneously with the seeding stage is of an economic nature (the sulphur-containing amino acid or acids are not partially destroyed by any heat treatment or pasteurization before the seeding) and of a practical nature.

 According to another particular embodiment, the stage of incorporation of at least
30 one sulphur-containing amino acid takes place after the seeding stage and before the fermentation stage, the sulphur-containing amino acid or acids being incorporated at a concentration of approximately 5 to approximately 50 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 30 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 20 mg/l, in

2A

particular approximately 10 to approximately 15 mg/l, in particular approximately 12 to approximately 15 mg/l, and in particular 12.5 mg/l.

The benefit of incorporation after the seeding stage and before the fermentation stage is of a practical nature and ensures an increased survival of the bifidobacteria during the storage of the product.

It should be noted that in the case where the incorporation of the sulphur-containing amino acid or acids takes place before the pasteurization stage, the quantity of sulphur-containing amino acids to be incorporated must be increased by approximately 30 to 50% with respect to the case where this incorporation takes place after the optional pasteurization stage, i.e. in particular substantially simultaneously with the seeding stage or after the seeding stage. In fact, in the first case some of the sulphur-containing amino acids are destroyed during the pasteurization.

In other words, the top part of the concentration range for sulphur-containing amino acids of 50-75 mg/l which is included within the concentration range for sulphur-containing amino acids provided in the invention relates more specifically to the case where the incorporation of the sulphur-containing amino acids takes place prior to a pasteurization stage.

It should be noted that it is possible to envisage dividing the stage of incorporation of sulphur-containing amino acids into two or more sub-stages, which can optionally occur at different times in the process according to the invention. The concentration of sulphur-containing amino acids which is indicated above then corresponds to the total concentration of sulphur-containing amino acids at the end of the different sub-stages of incorporation of sulphur-containing amino acids.

According to a preferred embodiment, the process for the preparation of a fermented food product as defined above comprises a stage of addition of an intermediate preparation simultaneously with the seeding stage or between the seeding stage and the fermentation stage, so as to obtain, from the seeded substance, a completed seeded substance, or after the fermentation stage, so as to obtain, from the fermented substance, a completed fermented substance, said intermediate preparation comprising a preparation of fruits and / or cereals and / or additives such as flavourings and colourings, and said stage of addition of an intermediate preparation can take place simultaneously with the stage of incorporation of at least one sulphur-containing amino acid.

The intermediate preparation can in particular contain thickeners (soluble and insoluble fibres, alginates, carrageenans, xanthan gum, pectin, starch, in particular

gelatinized, gelan gum, cellulose and its derivatives, guar and carob gum, inulin) or sweeteners (aspartame, acesulphame K, saccharine, sucralose, cyclamate) or preservatives.

5 Examples of flavourings are: apple, orange, strawberry, kiwi fruit, cocoa flavouring etc.

Examples of colourings are: beta-carotene, carmine, cochineal red.

Moreover, the preparation of the abovementioned fruits can comprise fruits which are whole or in pieces or in jelly or in jam, making it possible for example to obtain fruit yogurts.

10 The intermediate preparation can also contain plant extracts (soya, rice etc.).

According to another embodiment of the invention, the seeding stage comprises inoculation with seeding ferments containing approximately 10^6 to approximately $2 \cdot 10^8$, more particularly approximately 10^6 to approximately 10^7 bifidobacteria, per ml (or per gram) of starting substance.

15 If a quantity of bifidobacteria greater than this range is inoculated, undesired acetic acid type tastes can develop. If a quantity of bifidobacteria less than this range is inoculated, the final quantity of bifidobacteria is insufficient.

Advantageously, in the process for the preparation of a fermented food product according to the invention, the bifidobacteria are chosen from bacteria of the type
20 *Bifidobacterium animalis*, in particular *Bifidobacterium animalis animalis* and / or *Bifidobacterium animalis lactis*, and / or *Bifidobacterium breve* and / or *Bifidobacterium longum* and / or *Bifidobacterium infantis* and / or *Bifidobacterium bifidum*.

Particularly preferably, in the process for the preparation of a fermented food product according to the invention, the bifidobacteria are chosen from bacteria of the type
25 *Bifidobacterium animalis*.

Advantageously, in the process for the preparation of a fermented food product according to the invention, the seeding ferments contain lactic bacteria, in particular one or more bacteria of the genus *Lactobacillus spp.* and in particular *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* and / or *Lactobacillus casei* and / or *Lactobacillus reuteri* and / or
30 *Lactobacillus acidophilus* and / or *Lactobacillus helveticus* and / or *Lactobacillus plantarum*, and / or bacteria of the type *Lactococcus cremoris* and / or *Streptococcus thermophilus* and / or *Lactococcus lactis* and / or one or more bacteria of the genus *Leuconostoc*.

According to an advantageous embodiment of the process for the preparation of a fermented food product as defined above, the proportion of bifidobacteria in the seeding ferments is approximately 20 to approximately 75%, in particular approximately 30 to approximately 50%, in particular approximately 35 to approximately 40%, in particular approximately 37.5%.

By "proportion of the bifidobacteria in the seeding ferments", is meant the proportion of the bifidobacteria relative to all of the inoculated bacteria in total during the seeding stage.

This proportion corresponds to an optimum in terms of cost and final concentration of bifidobacteria, given that the higher the concentration of bifidobacteria at the start, the more competitive they are in terms of growth relative to the other strains in the ferments, and the more rapidly the optimum concentration of bifidobacteria is reached.

According to a preferred embodiment of the process for the preparation of a fermented food product as defined above, the starting substance is based on plant juice and in particular fruit juice or vegetable juice such as soya juice, or on a dairy product, and in particular cow's milk and / or goat's milk.

The starting substance can also comprise sheep's and / or camel's and / or mare's milk.

In the case where the fermented food product is a dairy product, the starting substance can comprise milk, milk powder, sugar, a mixture of milk and plant juice, a mixture of milk and fruit juice, a mixture of milk and starch.

Advantageously, the process for the preparation of a fermented food product according to the invention is such that the pasteurized starting substance is a pasteurized starting substance, which is held, optionally homogenized, and cooled down, obtained from a raw material, said process comprising, before the seeding stage, the following successive stages:

- a stage of standardization of fatty substances of the raw material so as to obtain a standardized substance,
- a stage of enrichment with dried matter of the standardized substance obtained in the preceding stage, so as to obtain an enriched substance,
- a stage of pre-heating of the enriched substance obtained in the preceding stage, so as to obtain a starting substance,
- a stage of pasteurization and holding of the starting substance obtained in the preceding stage, so as to obtain a pasteurized and held substance,

- an optional stage of homogenization of the pasteurized and held substance obtained in the preceding stage, so as to obtain a pasteurized, held and optionally homogenized substance,
- a stage of initial cooling of the pasteurized, held and optionally homogenized substance obtained in the preceding stage, so as to obtain a pasteurized starting substance, held, optionally homogenized, and cooled down.

By "standardization of fatty substances" is meant a stage of bringing the quantity of fats present in the starting substance to a pre-determined level.

Enrichment with dried matter involves the addition of proteins and fatty substance in order to modify the firmness of the curd.

"Holding" involves a rapid thermization of the milk and makes it possible to destroy the vegetative microbial flora, including pathogenic forms. Its typical duration is from 4 to 10 minutes, in particular from 5 to 8 minutes, and in particular approximately 6 minutes.

By "homogenization" is meant the dispersion of the fatty substances in the milk-type substance into small fat globules. The homogenization is carried out for example at a pressure of 100 to 280 bars, in particular 100 to 250 bars, in particular 100 to 200 bars, in particular approximately 200 bars. This homogenization stage is purely optional. It is in particular absent from the production process of products with 0% fatty substances.

According to a particular embodiment, the process for the preparation of a fermented food product as defined above comprises a packaging stage between the seeding stage and the fermentation stage, said packaging stage making it possible to obtain, from the seeded substance obtained in the seeding stage, a seeded and packaged substance.

This particular embodiment corresponds to the case of the firm-type fermented food products.

More particularly, the process for the preparation of a fermented food product as defined above comprises:

- a stage of seeding a starting substance, optionally pasteurized, by inoculation with seeding ferments containing approximately 10^6 to approximately $2 \cdot 10^8$ bifidobacteria, more particularly approximately 10^6 to approximately 10^7 bifidobacteria per ml of starting substance, in order to obtain a seeded substance,

- a stage of packaging the seeded substance obtained in the preceding stage, in order to obtain a packaged seeded substance,
- a stage of fermentation of the packaged seeded substance obtained in the preceding stage, such that the temperature at the start of fermentation is approximately 36 to approximately 43°C, in particular approximately 37 to approximately 40°C, the temperature at the end of fermentation is approximately 37 to approximately 44°C, in particular approximately 38 to approximately 41°C, and the fermentation time is approximately 6 to approximately 11 hours, in order to obtain a fermented substance,
- a stage of final cooling of the fermented substance obtained in the preceding stage, such that the temperature at the start of the final cooling is less than approximately 22°C and the temperature at the end of the final cooling is approximately 4 to approximately 10°C, so as to obtain a fermented food product.

According to an alternative embodiment, not involving the preparation of firm-type products, the process for the preparation of a fermented food product according to the invention comprises the following successive stages after the fermentation stage:

- a stage of intermediate cooling of the fermented substance obtained in the fermentation stage, so as to obtain a pre-cooled substance,
- a stage of storage of the pre-cooled substance obtained in the preceding stage, so as to obtain a stored substance,
- a stage of final cooling of the stored substance obtained in the preceding stage, so as to obtain a fermented food product.

According to a preferred embodiment, said fermentation stage is such that the temperature at the start of fermentation is of approximately 36 to approximately 43°C and in particular approximately 37 to approximately 40°C, the temperature at the end of fermentation is approximately 37 to approximately 44°C and in particular approximately 38 to approximately 41°C, and the fermentation time is approximately 6 to approximately 11 hours.

Advantageously, said intermediate cooling stage is such that the intermediate cooling time is approximately 1 hour to approximately 4 hours and in particular approximately 1 hour 30 minutes to approximately 2 hours and the intermediate cooling temperature is approximately 4 to approximately 22°C.

Preferably, said storage stage is such that the storage time is less than or equal to approximately 40 hours.

Advantageously, said final cooling stage is such that the temperature at the start of final cooling is less than approximately 22°C and the temperature at the end of final cooling is approximately 4 to approximately 10°C.

According to a preferred embodiment, the process for the preparation of a fermented food product according to the invention comprises:

- a stage of seeding a starting substance, optionally pasteurized, by inoculation with seeding ferments containing approximately 10^6 to approximately $2 \cdot 10^8$, more particularly approximately 10^6 to approximately 10^7 bifidobacteria per ml (or per gram) of starting substance in order to obtain a seeded substance,
- a stage of fermentation of the seeded substance obtained in the preceding stage, such that the temperature at the start of fermentation is approximately 36 to approximately 43°C, in particular approximately 37 to approximately 40°C, the temperature at the end of fermentation is approximately 37 to approximately 44°C, in particular approximately 38 to approximately 41°C, and the fermentation time is approximately 6 to approximately 11 hours, in order to obtain a fermented substance,
- a stage of intermediate cooling of the fermented substance obtained in the preceding stage, such that the intermediate cooling time is approximately 1 hour to approximately 4 hours, in particular approximately 1 hour 30 minutes to approximately 2 hours and the intermediate cooling temperature is approximately 4 to approximately 22°C, so as to obtain a pre-cooled substance,
- a stage of storage of the pre-cooled substance obtained in the preceding stage, such that the storage time is less than or equal to approximately 40 hours, so as to obtain a stored substance,
- a stage of final cooling of the stored substance obtained in the preceding stage, such that the temperature at the start of final cooling is less than approximately 22°C and the temperature at the end of final cooling is approximately 4 to approximately 10°C so as to obtain a fermented food product.

According to a particular embodiment of the process for the preparation of a fermented food product as defined above, an additional stirring stage is provided between the fermentation stage and the intermediate cooling stage, making it possible to obtain, from the fermented substance obtained in the fermentation stage, a stirred fermented substance.

By "stirring" is meant a process of mechanical stirring using a turbine or helical stirrer. It is a stage which determines the oiliness of the product in particular the dairy product. If the stirring is too violent, incorporation of air and separation of the serum can occur. If the stirring is insufficient, the product risks subsequently becoming too thick.

According to a particular embodiment, the process for the preparation of a fermented food product according to the invention comprises, after the final cooling stage, a stage of preservation of the fermented food product at a temperature comprised between approximately 4 and approximately 10 °C

The invention also relates to a fermented food product as obtained from the process as defined above.

Brief description of the figures

Figure 1 represents a comparison of the effects of cysteine and vitamin C on the acidification of milk by the ferment of Example 1. The time in minutes is shown along the x-axis, the pH along the y-axis. Curve A: control without vitamin C or cysteine; curve B: vitamin C; curve C: cysteine.

Figure 2 represents the development of the population of bifidobacteria in the control model during preservation at 10°C. Along the x-axis, the preservation time in days; along the y-axis, the population of bifidobacteria in CFU/ml. ■: with 15 mg/l of filtered cysteine; ▲: without cysteine.

Figure 3 represents the development of the population of bifidobacteria in the milk as a function of the treatment of the stimulant. X-axis: preservation time in days; y-axis: population in CFU/ml. Conditions: ■, control without cysteine or methionine; ○, autoclaved cysteine; ●, filtered cysteine; □, autoclaved methionine; dotted curve, filtered methionine.

Figure 4 represents the monitoring of the population of bifidobacteria in the control model during preservation at 10°C. X-axis: preservation time in days; y-axis: population in CFU/ml. ■: cysteine at 12 mg/l incorporated before pasteurization; ▲: control without cysteine.

Examples

Example 1: Study of the mode of action of cysteine as a stimulant

A ferment comprising *Streptococcus thermophilus* (CNCM: I-1630) + *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (CNCM: I-1632) + *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (CNCM: I-1519) + *Bifidobacterium animalis ssp lactis* (CNCM: I-2494) is used.

This example involves studying the mode of action of cysteine as a stimulant, and determining whether it has a metabolic or antioxidant effect.

The growth of bifidobacteria in milk is measured in the presence of a solution of vitamin C (0.5 g/l) completely reducing the oxygen in the medium, and a solution of cysteine (50 mg/l).

Constitution of the product model:

Milex skimmed milk powder supplied by Arla food: 120 g

Water: quantity sufficient for 1 kg

A heat treatment is carried out involving pasteurization for 30 minutes at 95°C in a bubbling water bath.

The cysteine is supplied by Sigma. The solution is prepared at 500 g/l, filtered on a 0.2 µm Nalgène filter unit. This solution is used injected sterilely into the pasteurized model for a final concentration of 50 mg/l.

The vitamin C is supplied by Sigma. The solution is prepared at 100 g/l, filtered on a 0.2 µm Nalgène filter unit (cat. 156-4020, Nalge Europe Ltd, Belgium). This solution is used injected sterilely into the pasteurized model for a final concentration of 0.5 g/l.

The seeding doses of the product model are given in Table 1 which follows.

Table 1: Seeding doses

	Volume for 1 l in µl		
	Control	Filtered cysteine	Vitamin C
I-1630	100	100	100
I-1519 + I-1632	220	220	220
I-2494	190	190	190
Cysteine		100	
Vitamin C			5 ml

The seeding is 5.10^6 CFU/ml of *Streptococcus thermophilus* and 5.10^6 CFU/ml of *Lactobacillus bulgaricus*.

The monitoring of the acidification of the model at 37°C is represented in Table 2 below as well as in Figure 1.

5

Table 2: Monitoring of the acidification of the model

	Vitamin C	Filtered cysteine	Control
Ta	86	90	83
Vmax	-0.0079	-0.01046	-0.00791
pHm	5.96	5.82	6.06
Tmax	184	208	180
pH0	6.5	6.6	6.7
TpH 5.5	260	248	270
TpH 5	391	354	412
TpH 4.8	479	417	506
D0 CFU/ml	$1.02.10^8$	$2.79.10^8$	$1.47.10^8$

- Ta = latency time (in minutes)
- 10 Vmax = maximum rate (in pH units /minute)
- pHm = pH at the maximum acidification rate
- Tmax = time at Vmax (in minutes)
- pH0 = pH at start of fermentation
- TpH 5.5 = time to arrive at pH 5.5 (in minutes)
- 15 TpH 5 = time to arrive at pH 5 (in minutes)
- TpH 4.8 = time to arrive at pH 4.8 (in minutes)
- D0 CFU/ml = quantity of bifidobacteria obtained at the end of the fermentation.
- It is noted that the acidification curve in the presence of cysteine differs from the acidification curve in the presence of vitamin C, which is itself virtually indistinguishable from the control acidification curve without vitamin C or cysteine. Given that vitamin C is an antioxidant, it is deduced from this that the stimulant effect of cysteine is not an antioxidant effect but is more certainly an effect of providing essential amino acid.
- 20

Example 2: Determination of the cysteine stimulant dose

A ferment comprising *Streptococcus thermophilus* (CNCM: I-2272) + *Streptococcus thermophilus* (CNCM: I-2773) + *Streptococcus thermophilus* (CNCM: I-2130) + *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (CNCM: I-1519) + *Bifidobacterium animalis ssp lactis* (CNCM: I-2494) is used.

5 “Milk models” are constituted by standard stirred yogurts comprising the ferment described above.

The use of 0.2 µm-filtered cysteine was assessed in the “milk models” in proportions comprised from 5 mg/l to 50 mg/l (preferably from 5 to 20 mg/l).

10 For the bifidobacteria counting method, reference may be made to M. Grand et al., Quantitative analysis and molecular identification of bifidobacteria strains in probiotic milk products, Eur. Food Res. Technol. 217:90-92 (2003).

15 The population of bifidobacteria for the test containing the highest concentration of L cysteine is 3.10^8 CFU/ml at D+24h, D corresponding to the time of packaging the product and remains stable after preservation for up to 28 days at 10°C. The standard control population (Control population D0: 1.10^8 CFU/ml) is 9.10^7 CFU/ml at 28 days of preservation at 10°C.

The population of bifidobacteria for the test containing the lowest concentration of L cysteine is 1.10^8 CFU/ml at D+24h.

20 Certain products have an undesirable taste characterized by a sulphur note which can be detected as from 0.002% of added cysteine. Below this cysteine concentration the products are accepted: a dose of 0.0015% represents a good compromise between the organoleptic constraints and constraints in terms of a *Bifidobacterium* population $>2.10^8$ CFU/ml.

25 Growth tests on milk carried out in the presence of 0.0015% i.e. 15 mg/l of filtered cysteine have made it possible to reach a *Bifidobacterium* I-2494 population of $2.8.10^8$ CFU/ml after 28 days of preservation at 10°C (the development of the population relative to the control without cysteine is represented in Figure 2).

From a sensory analysis point of view, the products produced do not have a detectable undesirable taste in comparison with the standard.

30

Example 3: Acidification kinetics

The ferment described in Example 2 is used.

37

The acidification kinetics of milk in the presence (15 mg/L) of the optimum dose of cysteine and in the absence of cysteine (control) show the absence of the effect of the cysteine on the overall kinetics.

5 Example 4: Effect of the type of treatment of the sulphur-containing amino acid

The impact of sterilization by filtration or thermization of the cysteine and methionine is assessed (final concentration used: 50 mg/l).

The solutions are either filtered at 0.2 µm or autoclaved for 5 minutes at 121°C then frozen in the form of beads in liquid nitrogen.

10 Constitution of the model:

Milex skimmed milk powder supplied by Arla food: 120 g

Water: quantity sufficient for 1 kg

Heat treatment: pasteurization for 30 minutes at 95°C in a bubbling water bath

15 Cysteine: supplier Sigma. The solution is prepared at 500 g/l, filtered on a 0.2 µm Nalgène filter unit or sterilized at 121°C for 5 minutes by an autoclave controlled by temperature probe (Fetinge France S.A., reference KL 60/101). This solution is injected sterilely into the pasteurized model for a final concentration of 50 mg/l.

20 Methionine: supplier Sigma. The solution is prepared at 300 g/l; the filtration or sterilization treatment is identical to that carried out for the cysteine solution. This solution is injected sterilely into the pasteurized model for a final concentration of 50 mg/l.

The seeding doses are referred to in Table 3 below.

Table 3: Seeding doses

	Volume for 1 l in µl				
	Control	Filtered cysteine	Autoclaved cysteine	Filtered methionine	Autoclaved methionine
I-1630	100	100	100	100	100
I-1519 + I-1632	220	220	220	220	220
I-2494	95	95	95	95	95
Filtered cysteine		100			
Autoclaved cysteine			100		
Filtered methionine				100	

The seeding is 5.10^6 CFU/ml of *Streptococcus thermophilus* and 5.10^6 CFU/ml of *Lactobacillus bulgaricus*.

The monitoring of the population of bifidobacteria in the model preserved at 4°C as a function of the various conditions above is represented in Figure 3 as well as in Table 4 below:

Table 4: Development of the population of bifidobacteria

	D0 CFU/ml	D10 CFU/ml	D24 CFU/ml	D29 CFU/ml
Filtered cysteine	$5.1.10^8$	$4.3.10^8$	$4.0.10^8$	$2.3.10^8$
Autoclaved cysteine	$3.1.10^8$	$5.2.10^8$	$2.8.10^8$	$1.7.10^8$
Filtered methionine	$4.0.10^8$	$6.2.10^8$	$3.4.10^8$	$2.3.10^8$
Autoclaved methionine	$3.4.10^8$	$3.5.10^8$	$3.5.10^8$	$2.8.10^8$
Control	$1.7.10^8$	7.10^7	5.10^7	2.10^7

The reference time D0 corresponds to placing in pots (packaging). The measurements at D10, D24, D29 are carried out 10 days, 24 days, 29 days respectively after this placing in pots.

In all cases the population of bifidobacteria is increased by the supply of cysteine or methionine. No effect of the heat treatment on the effectiveness of the stimulants can be observed under the test conditions. The heat treatment applied to the cysteine at 50 mg/l degrades only a part thereof, the residual concentration (not assessed) is sufficient to improve the population of bifidobacteria.

Example 5: Development of the population of bifidobacteria during preservation in the case of incorporation of cysteine before pasteurization

The dose of 12 mg/l of cysteine is defined as having a stimulant effect responding to the target population (2.10^8 CFU/ml) and responding positively in organoleptic terms (no detectable difference). This concentration was assessed on direct incorporation in the model and pasteurized composition (95°C, 30 minutes).

The monitoring of the population of bifidobacteria in the product model during preservation at 10°C is represented in Figure 4.

The population of *Bifidobacterium* is $2.4 \cdot 10^8$ CFU/ml at D1 (i.e. 24 hours of storage) and remains stable after 44 days of preservation at 10°C (above $1.4 \cdot 10^8$ CFU/ml). The stimulant effect is clearly demonstrated relative to the standard control ($1.6 \cdot 10^8$ CFU/ml at D1; $7.65 \cdot 10^7$ CFU/ml at D8; $2 \cdot 10^7$ CFU/ml at D28; $1.8 \cdot 10^7$ CFU/ml at D35; $8.5 \cdot 10^6$ CFU/ml at D44) under these conditions: the population at D0 is higher when the sulphur-containing amino acids are used and the maintenance of the population during the life of the product is very much improved. This stimulant effect however remains less effective than the addition of 0.2 µm filtered cysteine to the model ($3 \cdot 10^8$ CFU/ml), the heat treatment resulting in a degradation of the cysteine (residual concentration less than 15 mg/l). An initial overdosage of the quantity of cysteine is to be provided in the case where the cysteine undergoes a heat treatment.

Conclusions relating to the conditions of utilization of cysteine:

- the utilization of directly filtered cysteine (with the ferment) preserves the cysteine;
- its addition to the composition of the heat-treated model produces a slightly less good result in terms of population but account must be taken of the degradation of the cysteine during the heat treatment (less available);
- its addition via a heat-treated dairy ingredient (for example GlycoMacroPeptide corresponding to the fragment 106-169 of kappa caseine) produces less good results (less available);
- its addition in the frozen form to the ferment is possible.

Example 6: production of a fatty stirred yogurt according to the invention on the laboratory scale (micro-production)

1. Composition of the milk and rehydration

The stirred yogurt comprises the following ingredients: skimmed milk with 0% fat, cream with 40% fat and skimmed milk powder with 33% proteins.

Firstly, all the ingredients are combined together in order to standardize the milk at a protein level (PL) of 4.4%, a fat level of 3.5% (FL) and a dried matter level of 15.8% with stirring of the medium for 60 minutes at approximately 750 rpm with a HEIDOLPH® stirrer in order for the proteins to rehydrate.

Control of the standardization is carried out with a MILKOSCAN FT 120® infrared detector from FOSS®. Below, an example of the necessary quantities of each ingredient in order to obtain the targets characterizing the milk.

Ingredients	In %
Skimmed milk 0% fat	87.5
Cream with 40% fat	8.7
Skimmed milk proteins 33% PL	3.8
TOTAL	100

2. Homogenization

The milk is then heated between 50°C and 60°C in order to melt the fat globules. Once the temperature is reached, the 10 litres are homogenized with a MICROFLUIDIZER® from MICROCORPS®. This makes it possible to break up the fat globules by passing the capillary milk through a grid under a pressure of 350 bars.

3. Pasteurization

A MEMMERT® water bath is prepared and adjusted to 103°C. The milk is transferred into 8 1-litre bottles, with a precise weighing of this quantity for each bottle.

The bottles are immersed in the water bath up to the bottom of the neck at 103°C for 35 minutes, then 10 minutes at 95°C in the same water bath.

4. Cooling and storage

The bottles are cooled down in a cold water bath with a continuous flow, then stored at 4°C in a refrigerator for 12 to 24 hours according to the test schedule envisaged.

5. Holding

The milk bottles are removed from the refrigerator 45 minutes before the inoculation of the ferments and placed in a water bath at the considered fermentation temperature, i.e. 37°C.

6. Fermentation

After inoculation of the ferments (5.10⁶ CFU/ml of Streptococcus thermophilus; 5.10⁶ CFU/ml of Lactobacillus bulgaricus; 5.10⁶ CFU/ml of bifidobacteria) and L-cysteine (15 mg/l) at the fermentation temperature of 37°C, the bottles are re-immersed in the water bath, and the acidification is monitored by a CINAC® from YSEBAERT® up to a pH of 4.8.

7. Cutting of coagulum and smoothing

The coagulum in the bottle is cut by hand. The yogurt with cut coagulum is poured into the hopper of the smoothing platform. The smoothing takes place via a metal grid with a porosity of 500 microns and the smoothed product is cooled down to 20°C via an exchange circuit in iced water.

8. Packaging and storage

Packaging is carried out manually in 125-ml pots and the lid is heat-sealed with a DNV-100-25 PPV-A® heat sealer from FESTO®. The products are stored in a cooler at 10°C throughout the test.

5

Example 7: Assessment of the dose of cysteine to be added in order to obtain a product with good organoleptic quality and containing the target population of Bifidobacteria

Different products were prepared with increasing doses of cysteine (see the table below).

10

The control was the standard dairy product containing the ferment.

Range:

volume / 1L	Cysteine dose	
3.2 mL	0.0080%	80 mg/L
2 mL	0.0050%	50 mg/L
0.8 mL	0.0020%	20 mg/L
0.4 mL	0.0010%	10 mg/L
0.2 mL	0.0005%	5 mg/L

Each product was tasted by 4 individuals who were very familiar with the reference product from an organoleptic point of view. These individuals gave their opinions in terms of the presence of bad tastes (sulphur taste, acid note), the reference being the standard product containing no cysteine.

15

Results

Test	Populations (CFU/mL)			Sensory assessment (n=4)
Time	T0	T pH4.8	Tf 495min	
1	4.40E+06	/	1.70E+08	Sulphur taste and/or acid note detected by all the tasters
0.008%				
2	4.70E+06	1.90E+08	2.40E+08	Sulphur taste and/or acid note detected by all the tasters
0.005%				
3	3.30E+06	2.50E+08	3.10E+08	Sulphur taste and/or acid note detected by all the tasters

42

0.002%				
4	/	/	/	Sulphur taste and/or acid note detected by all the tasters
0.0015%				
5	3.10E+06	1.50E+08	2.40E+08	No unpleasant taste detected
0.001%				
6	3.90E+06	1.10E+08	1.20E+08	No unpleasant taste detected
0.0005%				

5 The 0.0015% dose not yet being optimum from an organoleptic point of view, the 0.00125% dose was tested. This dose represents a very good compromise between the constraint in terms of population maintenance and the constraint in terms of organoleptic quality.

The sensory profile of a product with 0.00125% (12.5 mg/l) added cysteine was produced by a jury of experts comprising 15 individuals trained in this type of tasting.

10 Two repetitions were carried out. The tasters had to judge the products on the basis of 23 descriptors. The results based on these descriptors (essential for defining the organoleptic quality of the product relative to the reference product) showed no significant harmful difference on the basis of these descriptors. These descriptors were the following:

Product appearance

- 15 - Visual whey (visual assessment of the quantity of whey on the product surface)

Texture on the spoon before stirring

- Shape holding ability (relates to the stability of the structure of the product)

Texture on the spoon after stirring of the product

- Thickness (resistance to the movement of the spoon)

- 20 - Thread (continuity of the flow thread)

- Covering (quantity of product which covers the back of the spoon)

Texture in the mouth after stirring of the product

- Melting away (speed of disappearance of the product in the mouth)

- Coating (coats the inside of the mouth)

- 25 - Fat (Sensation of fat in the mouth)

- Soft (Tactile sensation of softness in the mouth)

Flavours

- Acid
- Sweet
- Bitter
- Astringent

Milk flavourings

- Unpleasant tastes
- Cream
- Butter
- Milk
- Fromage frais
- Acetaldehyde
- Lactoserum
- Lactone
- Lemon
- Potato

5

10

15

20

The sought result is an absence of significant difference between the control product and the product supplemented with cysteine.

In the present case, a product according to the invention, supplemented with 12.5 mg/l of cysteine exhibits no significant difference in terms of appearance, texture, flavours and tastes relative to the control product.

44

CLAIMS

1. Use of at least one sulphur-containing amino acid, at a total concentration of approximately 5 to approximately 75 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 50 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 30 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 20 mg/l in the free form, for the implementation of a process for the preparation of a fermented food product using ferments containing bifidobacteria, which fermented food product has acceptable organoleptic properties, contains more than approximately $5 \cdot 10^7$, in particular more than approximately 10^8 bifidobacteria per gram of fermented food product for a preservation period of at least 30 days, in particular at least 35 days and does not contain more than 0.5% yeast extract or yeast autolysate.
2. Use of at least one sulphur-containing amino acid, at a total concentration of approximately 5 to approximately 30 mg/l, in particular approximately 10 to approximately 15 mg/l, in particular approximately 12 to approximately 15 mg/l, and in particular 12.5 mg/l, in the free form, for the implementation of a process for the preparation of a fermented food product using ferments containing bifidobacteria, which fermented food product has acceptable organoleptic properties, contains more than approximately $5 \cdot 10^7$, in particular more than approximately 10^8 bifidobacteria per gram of fermented food product for a preservation period of at least 30 days, in particular at least 35 days and does not contain more than 0.5% yeast extract or yeast autolysate.
3. Fermented food product, having acceptable organoleptic properties, containing ferments comprising more than approximately $5 \cdot 10^7$, in particular more than approximately 10^8 bifidobacteria per gram of fermented food product for a preservation period of at least 30 days, in particular at least 35 days and having a total concentration of sulphur-containing amino acids in the free form of approximately 5 to approximately 50 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 30 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 20 mg/l, in particular approximately 10 to approximately 15 mg/l, in particular approximately 12 to approximately 15 mg/l, and in particular 12.5 mg/l.

4. Fermented food product according to claim 3, in which the ratio of the number of bifidobacteria contained in the fermented food product at the end of the preservation period to the number of bifidobacteria contained in the fermented food product at the start of the preservation period of at least 30 days, in particular at least 35 days, is approximately 0.2 to approximately 0.8, in particular approximately 0.3 to approximately 0.7, in particular approximately 0.4 to approximately 0.5.

5. Fermented food product preserved for a preservation period of at least 30 days, in particular at least 35 days, at a temperature of approximately 4 to approximately 10°C, having acceptable organoleptic properties and containing ferments comprising more than approximately $5 \cdot 10^7$, in particular more than approximately 10^8 bifidobacteria per gram of fermented food product.

6. Fermented food product according to one of claims 3 to 5, containing approximately 5 to approximately 50 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 30 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 20 mg/l, in particular approximately 10 to approximately 15 mg/l, in particular approximately 12 to approximately 15 mg/l, and in particular 12.5 mg/l, of sulphur-containing amino acids and in particular approximately 5 to approximately 50 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 30 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 20 mg/l, in particular approximately 10 to approximately 15 mg/l, in particular approximately 12 to approximately 15 mg/l, and in particular 12.5 mg/l of cysteine and / or approximately 5 to approximately 30 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 15 mg/l, of methionine.

7. Fermented food product according to one of claims 3 to 6, containing less than approximately 0.5% (w/w) of substances containing more than approximately 1.7% sulphur-containing free amino acids.

8. Fermented food product according to one of claims 3 to 7, containing less than approximately 0.5% (w/w) of yeast extract and / or yeast autolysate and / or milk, plant or soya protein hydrolysate.

46

9. Fermented food product according to one of claims 3 to 8, in which the bifidobacteria are of the type *Bifidobacterium animalis*, in particular *Bifidobacterium animalis animalis* and / or *Bifidobacterium animalis lactis*, and / or *Bifidobacterium breve* and / or *Bifidobacterium longum* and / or *Bifidobacterium infantis* and / or *Bifidobacterium bifidum*.

10. Fermented food product according to one of claims 3 to 9, based on plant juice and in particular fruit juice or vegetable juice such as soya juice, or on a dairy product, and in particular cow's milk and / or goat's milk.

11. Fermented food product according to one of claims 3 to 10, in which the ferments contain lactic bacteria, in particular one or more bacteria of the genus *Lactobacillus spp.* and in particular *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* and / or *Lactobacillus casei* and / or *Lactobacillus reuteri* and / or *Lactobacillus acidophilus* and / or *Lactobacillus helveticus* and / or *Lactobacillus plantarum*, and / or bacteria of the type *Lactococcus cremoris* and / or *Streptococcus thermophilus* and / or *Lactococcus lactis* and / or one or more bacteria of the genus *Leuconostoc*.

12. Fermented food product according to one of claims 3 to 11, in which the proportion of bifidobacteria in the ferments is approximately 20 to approximately 80%, in particular approximately 30 to approximately 70%, in particular approximately 40 to approximately 60%, and in particular approximately 50%.

13. Fermented food product according to one of claims 3 to 12, presented in the form of a stirred fermented food product or a fermented food product for drinking or an infant fermented food product.

14. Process for the preparation of a fermented food product from a starting substance, comprising

- a stage of seeding a starting substance, optionally pasteurized, by inoculation with seeding ferments containing bifidobacteria, in order to obtain a seeded substance,
- a stage of fermentation of the seeded substance obtained in the preceding stage in order to obtain a fermented substance,

– a stage of incorporation of at least one sulphur-containing amino acid in the free form at a concentration of approximately 5 to approximately 75 mg/l in particular approximately 5 to approximately 50 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 30 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 20 mg/l, in particular approximately 10 to approximately 15 mg/l, in particular approximately 12 to approximately 15 mg/l, and in particular 12.5 mg/l, this stage of incorporation being able to occur

- either before the seeding stage,
- or substantially simultaneously with the seeding stage,
- or after the seeding stage and before the fermentation stage,

providing that the fermented food product does not contain more than 0.5% (w/w) of yeast extract and / or yeast autolysate.

15. Process according to claim 14, not comprising a stage of addition of additional substances containing one or more sulphur-containing amino acids.

16. Process according to claim 14, comprising a stage of addition of additional substances containing one or more sulphur-containing amino acids in the free form, the concentration of sulphur-containing amino acids in the free form in the additional substances being less than approximately 1.7%, preferably less than approximately 0.5%, and the concentration of said additional substances in the fermented food product being less than approximately 0.5%.

17. Process according to claim 14 or 16, comprising a stage of addition of additional substances constituted by a yeast extract and / or yeast autolysate and / or milk, plant or soya protein hydolysate at a concentration of less than approximately 0.5% (w/w).

18. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 14 to 17, also comprising a pasteurization stage taking place before the seeding stage, making it possible to obtain a pasteurized starting substance from the starting substance.

19. Process for the preparation of a fermented food product according to claim 18, in which the stage of incorporation of at least one sulphur-containing amino acid takes place before the pasteurization stage, the sulphur-containing amino acid or acids being incorporated at a concentration of approximately 5 to approximately 75 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 30 mg/l, in particular approximately 10 to approximately 15 mg/l, in particular approximately 12 to approximately 15 mg/l, and in particular 12.5 mg/l.

20. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 14 to 18, in which the stage of incorporation of at least one sulphur-containing amino acid takes place substantially simultaneously with the seeding stage, the sulphur-containing amino acid or acids being incorporated at a concentration of approximately 5 to approximately 50 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 30 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 20 mg/l, in particular approximately 10 to approximately 15 mg/l, in particular approximately 12 to approximately 15 mg/l, and in particular 12.5 mg/l.

21. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 14 to 18, in which the stage of incorporation of at least one sulphur-containing amino acid takes place after the seeding stage and before the fermentation stage, the sulphur-containing amino acid or acids being incorporated at a concentration of approximately 5 to approximately 50 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 30 mg/l, in particular approximately 5 to approximately 20 mg/l, in particular approximately 10 to approximately 15 mg/l, in particular approximately 12 to approximately 15 mg/l, and in particular 12.5 mg/l.

22. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 14 to 21, comprising a stage of addition of an intermediate preparation simultaneously with the seeding stage or between the seeding stage and the fermentation stage, so as to obtain, from the seeded substance, a completed seeded substance, or after the fermentation stage, so as to obtain, from the fermented substance, a completed fermented substance, said intermediate preparation comprising a preparation of fruits and / or cereals and / or additives such as flavourings and colourings, and said stage of

addition of an intermediate preparation can take place simultaneously with the stage of incorporation of at least one sulphur-containing amino acid.

5 23. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 14 to 22, in which the seeding stage comprises inoculation with seeding ferments containing approximately 10^6 to approximately $2 \cdot 10^8$, more particularly approximately 10^6 to approximately 10^7 bifidobacteria, per ml of starting substance.

10 24. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 14 to 23, in which the bifidobacteria are chosen from bacteria of the type *Bifidobacterium animalis*, in particular *Bifidobacterium animalis animalis* and / or *Bifidobacterium animalis lactis*, and / or *Bifidobacterium breve* and / or *Bifidobacterium longum* and / or *Bifidobacterium infantis* and / or *Bifidobacterium bifidum*.

15 25. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 14 to 24, in which the bifidobacteria are chosen from bacteria of the type *Bifidobacterium animalis*.

20 26. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 14 to 25, in which the seeding ferments contain lactic bacteria, in particular one or more bacteria of the genus *Lactobacillus spp.* and in particular *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* and / or *Lactobacillus casei* and / or *Lactobacillus reuteri* and / or *Lactobacillus acidophilus* and / or *Lactobacillus helveticus* and / or *Lactobacillus plantarum*, and / or bacteria of the type *Lactococcus cremoris* and / or *Streptococcus thermophilus* and / or *Lactococcus lactis* and / or one or more bacteria of the genus *Leuconostoc*.

30 27. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 14 to 26, in which the proportion of bifidobacteria in the seeding ferments is approximately 20 to approximately 75%, in particular approximately 30 to approximately 50%, in particular approximately 35 to approximately 40%, and in particular approximately 37.5%.

28. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 14 to 27, in which the starting substance is based on plant juice and in particular fruit juice or vegetable juice such as soya juice, or on a dairy product, and in particular cow's milk and / or goat's milk.

5

29. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 14 to 28, in which the starting substance is a pasteurized starting substance, which is held, optionally homogenized, and cooled down, obtained from a raw material, said process comprising, before the seeding stage, the following successive stages:

- 10 – a stage of standardization of fatty substances of the raw material so as to obtain a standardized substance,
- a stage of enrichment with dried matter of the standardized substance obtained in the preceding stage, so as to obtain an enriched substance,
- a stage of pre-heating of the enriched substance obtained in the preceding
- 15 stage, so as to obtain a starting substance,
- a stage of pasteurization and holding of the starting substance obtained in the preceding stage, so as to obtain a pasteurized and held substance,
- an optional stage of homogenization of the pasteurized and held substance obtained in the preceding stage, so as to obtain a pasteurized, held and
- 20 optionally homogenized substance,
- a stage of initial cooling of the pasteurized, held and optionally homogenized substance obtained in the preceding stage, so as to obtain a pasteurized starting substance, held, optionally homogenized, and cooled.

25 30. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 14 to 29, comprising a packaging stage between the seeding stage and the fermentation stage, said packaging stage making it possible to obtain, from the seeded substance obtained in the seeding stage, a seeded and packaged substance.

30 31. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 14 to 30, comprising:

- a stage of seeding a starting substance, optionally pasteurized, by inoculation with seeding ferments containing approximately 10^6 to approximately $2 \cdot 10^8$ bifidobacteria, more particularly approximately 10^6 to

approximately 10^7 bifidobacteria per ml of starting substance, in order to obtain a seeded substance,

- a stage of packaging the seeded substance obtained in the preceding stage, in order to obtain a packaged seeded substance,
- 5 – a stage of fermentation of the packaged seeded substance obtained in the preceding stage, such that the temperature at the start of fermentation is approximately 36 to approximately 43°C, in particular approximately 37 to approximately 40°C, the temperature at the end of fermentation is approximately 37 to approximately 44°C, in particular approximately 38 to approximately 41°C, and the fermentation time is approximately 6 to approximately 11 hours, in order to obtain a fermented substance,
- 10 – a stage of final cooling of the fermented substance obtained in the preceding stage, such that the temperature at the start of the final cooling is less than approximately 22°C and the temperature at the end of the final cooling is approximately 4 to approximately 10°C, so as to obtain a fermented food product.
- 15

32. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 14 to 29, comprising the following successive stages after the fermentation stage:

- 20 – a stage of intermediate cooling of the fermented substance obtained in the fermentation stage, so as to obtain a pre-cooled substance,
- a stage of storage of the pre-cooled substance obtained in the preceding stage, so as to obtain a stored substance,
- a stage of final cooling of the stored substance obtained in the preceding stage, so as to obtain a fermented food product.
- 25

33. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 14 to 29 or 32, in which the fermentation stage is such that the temperature at the start of fermentation is approximately 36 to approximately 43°C and in particular approximately 37 to approximately 40°C, the temperature at the end of fermentation is approximately 37 to approximately 44°C and in particular approximately 38 to approximately 41°C, and the fermentation time is approximately 6 to approximately 11 hours.

30

34. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 32 or 33 in which the intermediate cooling stage is such that the intermediate cooling time is approximately 1 hour to approximately 4 hours and in particular approximately 1 hour 30 minutes to approximately 2 hours and the intermediate cooling temperature is approximately 4 to approximately 22°C.

35. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 32 to 34 in which the storage stage is such that the storage time is less than or equal to approximately 40 hours.

36. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 32 to 35, in which the final cooling stage is such that the temperature at the start of final cooling is less than approximately 22°C and the temperature at the end of final cooling is approximately 4 to approximately 10°C.

37. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 14 to 29 or 32 to 36, comprising:

- a stage of seeding a starting substance, optionally pasteurized, by inoculation with seeding ferments containing approximately 10^6 to approximately $2 \cdot 10^8$, more particularly approximately 10^6 to approximately 10^7 bifidobacteria per ml of starting substance in order to obtain a seeded substance,
- a stage of fermentation of the seeded substance obtained in the preceding stage, such that the temperature at the start of fermentation is approximately 36 to approximately 43°C, in particular approximately 37 to approximately 40°C, the temperature at the end of fermentation is approximately 37 to approximately 44°C, in particular approximately 38 to approximately 41°C, and the fermentation time is approximately 6 to approximately 11 hours, in order to obtain a fermented substance,
- a stage of intermediate cooling of the fermented substance obtained in the preceding stage, such that the intermediate cooling time is approximately 1 hour to approximately 4 hours, in particular approximately 1 hour 30 minutes to approximately 2 hours and the intermediate cooling temperature

SS

is approximately 4 to approximately 22°C, so as to obtain a pre-cooled substance,

- a stage of storage of the pre-cooled substance obtained in the preceding stage, such that the storage time is less than or equal to approximately 40 hours, so as to obtain a stored substance,
- a stage of final cooling of the stored substance obtained in the preceding stage, such that the temperature at the start of final cooling is less than approximately 22°C and the temperature at the end of final cooling is approximately 4 to approximately 10°C so as to obtain a fermented food product.

38. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 32 to 37, comprising an additional stirring stage between the fermentation stage and the intermediate cooling stage, making it possible to obtain, from the fermented substance obtained in the fermentation stage, a stirred fermented substance.

39. Process for the preparation of a fermented food product according to one of claims 32 to 38, comprising after the final cooling stage, a stage of preservation of the fermented food product at a temperature comprised between approximately 4 and approximately 10 °C.

40. Fermented food product as obtained from the process of one of claims 14 to 39.

54

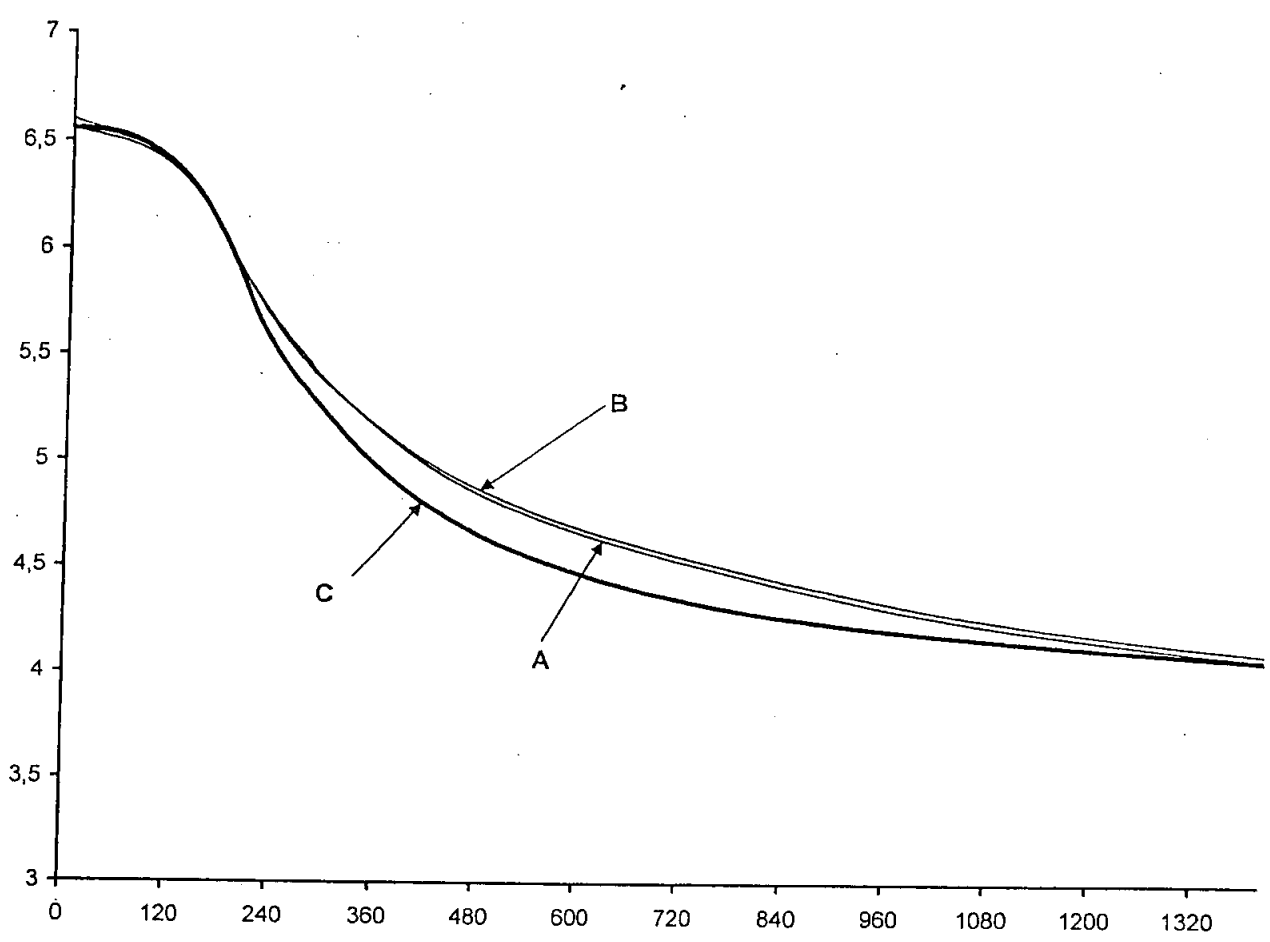


Fig 1

56

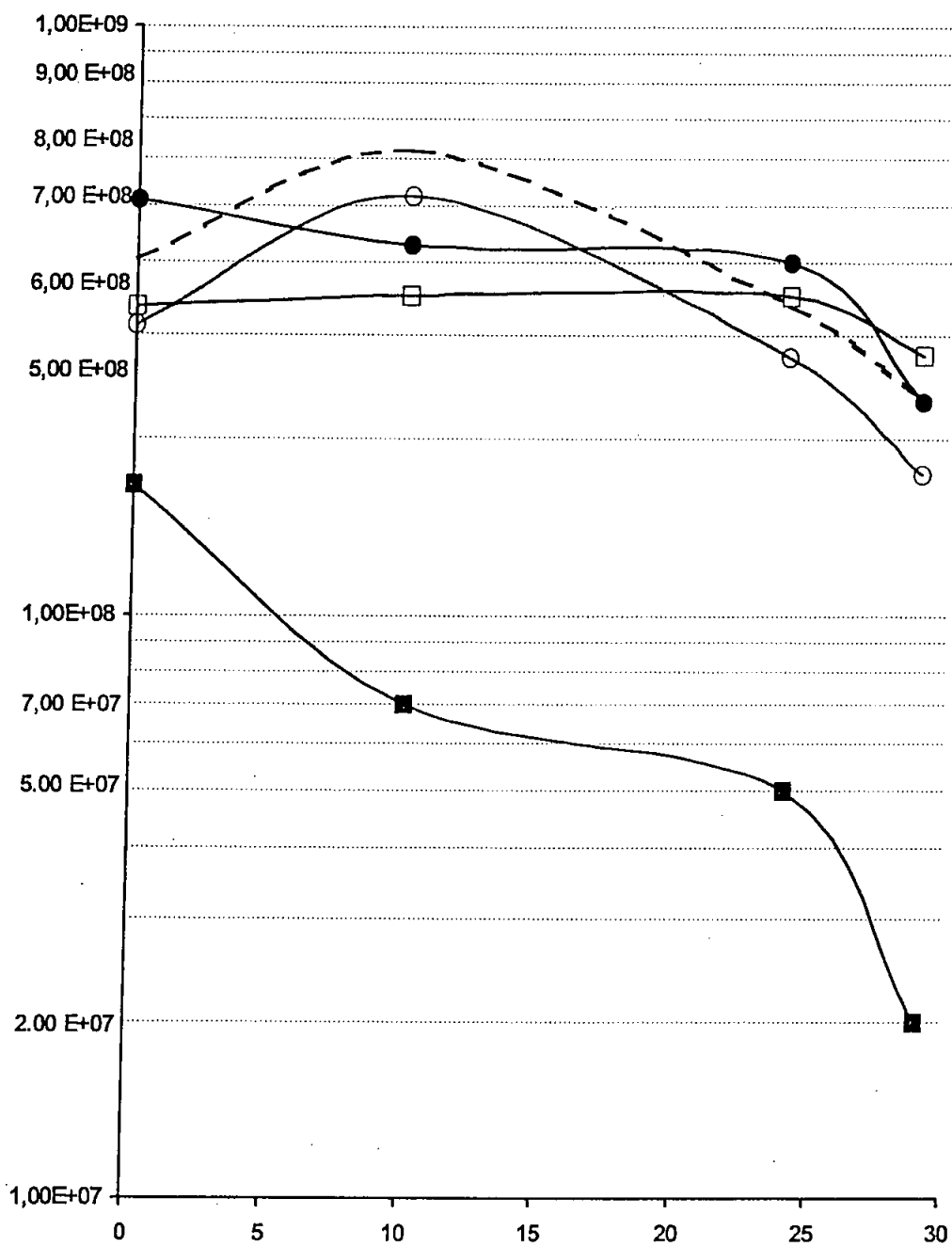


Fig. 3

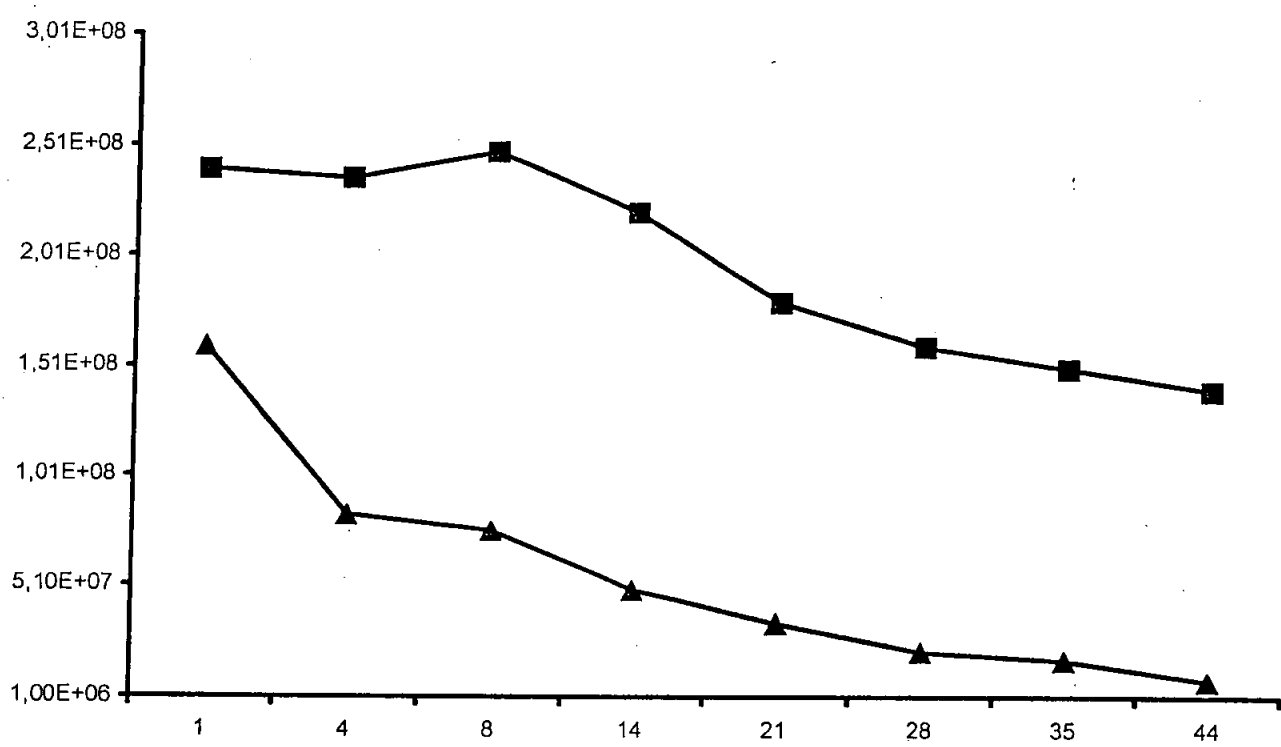


Fig 4

58

PRODUCTOS ALIMENTICIOS FERMENTADOS QUE CONTIENEN CEPAS

PROBIÓTICAS Y SU PROCESO DE PREPARACIÓN

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

La invención es concerniente con productos alimenticios
5 fermentados que contienen cepas probióticas y su proceso de
preparación.

Las bifidobacterias pertenecen a la flora anaeróbica
dominante en el colon. Las especies principales presentes del
colon humano son *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium*
10 *bifidum*, *Bifidobacterium longum ssp infantis*, *Bifidobacterium*
breve, *Bifidobacterium longum*.

Las bifidobacterias son bacterias probióticas de elección.
Las bacterias del género *Bifidobacterium* son usadas en numerosos
productos actualmente en el mercado y son frecuentemente
15 agregadas a productos lácteos que ya comprenden la bacteria
estándar en yogurt (*Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus*
bulgaricus).

El consumo de bifidobacteria es reconocido por ser benéfico
en el proceso de restablecer la población de bifidobacteria
20 normal en individuos que han sufrido terapia de antibióticos. Su
consumo también parece hacer posible reducir la constipación,
impedir la diarrea y reducir los síntomas de intolerancia a
lactosa.

Los probióticos son bacterias vivas. El uso de estas
25 bacterias vivas en la manufactura de productos alimenticios tales
como productos lácteos es engañoso en particular con respecto al
problema de sobrevivencia de estas bacterias en el producto.

El 80% de los productos actualmente en el mercado que
contienen bifidobacteria no satisfacen los criterios que hacen
30 posible mantener que mejore significativamente el tránsito

intestinal de los individuos que los consumen. Una ingestión diaria de por lo menos 10^8 a 10^9 células viables ha sido recomendada como la dosis mínima que hace posible tener un efecto terapéutico (Silva A.M., Barbosa F. H., Duarte R., Vieira L. Q., Arantes R. M., Nicoli J. R., Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice, J. Appl. Microbiol. 97 (2004) 29-37). La dosis requerida puede ser dependiente de la cepa probiótica usada.

En el caso de la producción de un producto alimenticio bioactivo que contiene bifidobacteria el problema por consiguiente surge de obtener una población suficiente de estas bacterias en el producto y mantenerlo durante "vida" del producto sin recurrir a las soluciones técnicas capaces de alterar las cualidades organolépticas del producto.

El problema del tamaño numérico de la población de cepas probióticas en un producto lácteo fermentado es un problema conocido (véase en particular D. Roy, Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products, Lait 85 (2005) 39-56, INRA, EDP Sciences).

Varias razones para este problema han sido sugeridas, incluyendo la reducción en la población durante el almacenamiento, el crecimiento alterado de estas bacterias que comienza de un cierto pH o bastantes simplemente la capacidad deficiente de estas bifidobacterias para crecer, en particular en leche.

Es conocido que los fruto-oligosacáridos, ciertos almidones, ciertos azúcares, glicerol y ciertos extractos de levadura tienen efectos bifidogénicos significativos. Por otra parte, el oxígeno es tóxico a ciertas cepas probióticas.

Por consiguiente, el uso de cisteína o ascorbato como

depurador de oxígeno se ha descrito por consiguiente (una
revisión de toxicidad de oxígeno en yogures probióticos:
influence on the survival of probiotic bacteria and protective
techniques. Talwalkar & Kailasapathy; Comprehensive Reviews in
5 Food Science and Food Safety, 3 (3) 117-124; 2004), sin sin
embargo habiendo o siendo demostrado que el uso de estas
sustancias hace posible obtener y mantener poblaciones de
bifidobacterias a los niveles deseados durante el almacenamiento.
Además, el efecto potencialmente negativo de la cisteína sobre
10 las propiedades finales de un yogurt se ha notado.

En general, los productos alimenticios fermentados que
tienen propiedades de mantenimiento relativo de las poblaciones
de bifidobacteria de la conservación de los productos y que son
descritos en la literatura no tienen en general propiedades
15 organolépticas aceptables, debido al hecho en particular que
sustancias tales como extracto de levadura están presentes en una
alta concentración en los productos.

El propósito principal de la invención es proporcionar
productos alimenticios fermentados que tienen propiedades
20 organolépticas aceptables y que contienen una alta concentración
de bifidobacterias al final del período de fermentación y en todo
el período de conservación de los productos alimenticios
fermentados.

El propósito principal de la invención es proporcionar
25 productos alimenticios fermentados que contienen bifidobacterias
en un buen estado fisiológico y que tienen una proporción de
supervivencia significativa durante el período de conservación de
los productos alimenticios fermentados, en particular hasta la
fecha de uso de los productos.

30 Otro propósito de la invención es proporcionar procesos de

preparación que son simples de implementar, haciendo posible obtener los productos anteriores.

Otro propósito de la invención es promover el crecimiento de las bifidobacterias en relación con las simbiosis estándar
5 presentes en yogurt, estas simbiosis están constituidas de manera estándar por una o más cepas de *Streptococcus thermophilus* y de *Lactobacillus vulgaricus*.

Los propósitos de la invención son obtenidos gracias al hallazgo sorprendente realizado por los inventores de que la
10 incorporación de aminoácidos que contienen azufre en la sustancia de partida durante la preparación de los productos alimenticios fermentados que contienen bifidobacterias, en una cantidad suficientemente pequeña para no alterar las propiedades organolépticas de los productos, hace posible obtener
15 rápidamente, después de la fermentación de las poblaciones, por lo menos 5×10^7 o 10^8 bifidobacterias por gramo de producto y sobrevivencia incrementada de las bifidobacterias hasta la fecha de uso de los productos, sin modificar necesariamente el crecimiento de las otras cepas bacterianas.

20 La invención es concerniente con el uso de por lo menos un aminoácido que contiene azufre, a una concentración total de aproximadamente 5 a aproximadamente 75 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular
25 aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l en forma libre, para la implementación de un proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado utilizando fermentos que contienen bifidobacterias, tal producto alimenticio fermentado tiene propiedades organolépticas aceptables, contiene más de
30 aproximadamente 5×10^7 , en particular más de aproximadamente 10^8

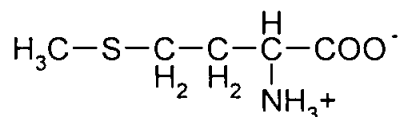
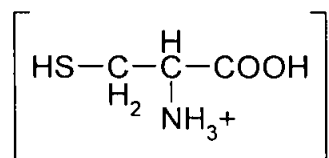
bifidobacterias por gramo de producto alimenticio fermentado para un período de conservación de por lo menos 30 días, en particular por lo menos 35 días y no contiene más de 0.5% de extracto de levadura o autolisado de levadura.

5 "Aminoácido que contiene azufre" significa cisteína (L-cisteína) o metionina también como sus derivados, opcionalmente en forma de sal.

En particular, pueden ser usados de acuerdo con la invención clorhidrato de L-cisteína monohidratada (monoclorhidrato de ácido
10 (R)-2-amino-mercaptopropiónico monohidratado) o L-metionina (ácido (S)-2-amino-4-metiltio-butírico) de las fórmulas respectivas:

$\text{Cl}^- \cdot \text{H}_2\text{O}$ y

15



"En forma libre" significa aminoácidos que no están enlazados a otros aminoácidos por un enlace de péptidos dentro de
20 péptidos, polipéptidos o proteínas.

Preferiblemente, los aminoácidos que contienen azufre de acuerdo con la invención son usados en forma reducida, esto es, el grupo sulfhidrilo -SH es reducido. Esta forma preferida de los aminoácidos que contienen azufre excluye por consiguiente en
25 particular cisteína, la forma oxidada de cisteína que involucra la combinación de dos cisteínas vía puente de disulfuro.

Las bifidobacterias están sustancialmente sin actividad proteolítica, es ventajoso usar los aminoácidos mencionados anteriormente en forma libre de tal manera que puedan ser
30 asimilados directamente por las bifidobacterias.

El aminoácido que contiene azufre o ácidos usados de acuerdo con la invención son filtrados ventajosamente de antemano y/o sometidos a autoclave (o pasteurizado, esto es, tratados a una temperatura mayor de 50°C) y/o irradiados, con el fin de tomar en
5 cuenta las restricciones de uso con respecto a contaminación microbiológica, esto es, de tal manera que esté sustancialmente sin contaminantes microbianos.

Si los aminoácidos que contienen azufre son usados a una concentración mayor de 75 mg/l, se nota una degradación de las
10 propiedades organolépticas del producto alimenticio.

Si los aminoácidos que contienen azufre son usados a una concentración menor a 5 mg/l, la población de las bifidobacterias mayor de 5×10^7 o 10^8 UFC/g de producto no pueden en general ser mantenidas durante el período de conservación del producto.

15 Se debe notar que la concentración de los aminoácidos que contienen azufre usados de acuerdo con la invención es concerniente cuando el aminoácido que contiene azufre o ácidos especialmente agregados durante la preparación de los productos. Esta concentración no toma en cuenta la producción bacteriana
20 posible de aminoácidos que contienen azufre durante la preparación ni aún de la cantidad de aminoácidos que contienen azufre en forma libre que están naturalmente presentes en la sustancia de partida que sirve para preparar el producto alimenticio (en leche) o en los adyuvantes que pueden ser usados
25 durante la preparación.

La concentración típica de los aminoácidos que contienen azufre presentes en la leche es de 100 a 1,300 mg/l, incluyendo apropiadamente 260 mg/l de cisteína y 1,020 mg/l de metionina (Manual de la composición de la leche, 1995, Academic Press). Se
30 debe notar que la vasta mayoría de estos aminoácidos que

contienen azufre presentes en la leche está en forma enlazada en cadenas de péptido o proteína.

"Fermentos" significa un conjunto de bacterias, en particular bacterias diseñadas para fermentación y/o bacterias
5 con valor probiótico.

"Propiedades organolépticas aceptables" significa en particular la ausencia de un sabor tipo azufre indeseable, tal como se determina mediante una prueba de análisis sensorial estándar que puede corresponder al protocolo descrito
10 posteriormente descrito en la presente.

El mecanismo sensorial comienza con la generación de un estímulo en seguida del consumo de un producto. Este estímulo permite una percepción que es dependiente de los factores genéticos y fisiológicos en el consumidor individual. Esta
15 percepción es luego verbalizada (una lista de palabras es propuesta al consumidor) luego cuantificada (uso de intervalos). Luego el consumidor da una determinación global del producto que ha consumido (esta determinación está influenciada por su cultura, sus experiencias) y dicen si estaría preparado par
20 comprar este producto (datos tales como costo, comunicación acerca de este producto pueden luego ser proporcionados).

El análisis sensorial es una ciencia basada en la percepción (fisiológico y psicológico) que involucra los cinco sentidos (gusto, olfato, vista, audición, contacto) y el uso de protocolos
25 muy rigurosos.

Los consumidores que constituyen el panel que lleva a cabo los análisis sensoriales son seleccionados en cuanto a sus habilidades sensoriales, sus habilidades en términos de verbalización, sus habilidades en términos de uso de intervalos
30 para la determinación y sus habilidades para trabajar en un grupo

(con el fin de obtener un consenso). Es absolutamente necesario verificar que las determinaciones que los miembros del panel sean repetibles, reproducibles, con una homogeneidad en términos de discriminación y en términos de clasificación. Las pruebas que
5 hacen posible verificar estos pre-requisitos son repetidos varias veces. La elección de productos se hace de acuerdo con tres criterios principales: de acuerdo con la edad del producto (se escogen los productos de la misma edad), estos productos deben ser representativos en el caso de una determinación estándar y
10 los productos son homogéneos (pocas diferencias entre ellos). Estos productos son presentados anónimamente y en forma codificada, en un cierto orden y homogéneamente (misma temperatura, etc.).

Las condiciones ambientales del análisis sensorial son
15 importantes: el aire acondicionado, la iluminación, el medio ambiente de sonido, la decoración (neutra si es posible) y olor en la sala en la cual el análisis se lleva a cabo deben ser estandarizados. Los miembros del panel son separados por cubículos. No deben fumar, consumir café o mentol en las horas
20 precedentes a la sesión de análisis. Tampoco deben usar perfume o maquillaje.

Al final de este análisis, un producto será considerado por tener "propiedades organolépticas aceptables" si los miembros del panel no han detectado un gusto tipo azufre indeseable en este
25 producto.

El período de conservación o almacenamiento del producto alimenticio fermentado es el período que sigue inmediatamente al final del proceso de preparación del producto alimenticio fermentado y su empaque. Durante este período de conservación el
30 producto alimenticio fermentado es usualmente conservado a una

temperatura que consiste entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10°C.

El producto alimenticio fermentado mencionado anteriormente contiene más de 5×10^7 , en particular más de 10^8 bifidobacterias por gramo de producto alimenticio fermentado en particular para un período de conservación de por lo menos 40 días. Más en particular, el producto alimenticio fermentado mencionado anteriormente contiene más de 5×10^7 , en particular más de 10^8 bifidobacterias por gramo de producto alimenticio fermentado hasta la fecha de uso del producto.

La fecha de uso depende de los períodos de conservación legales fijos por la legislación actual, que pueden variar comúnmente de 15 a 50 días a partir de la fecha de producción. Por ejemplo, el período de conservación legal es en general de 30 días para productos lácteos frescos.

Una población de bifidobacterias que es mayor o igual a 10^8 UFC/g a la fecha de uso del producto conservado entre 4 y 10°C puede ser considerada una población suficiente de bifidobacterias dadas las recomendaciones médicas concernientes con la condición de bifidobacterias en alimentos.

"No contiene más de 0.5% de extracto de levadura o autolisado de levadura" significa en particular que el producto alimenticio fermentado mencionado anteriormente no contiene más de 0.5% de extracto de levadura o autolisado de levadura al final de su proceso de preparación y/o que el producto alimenticio fermentado mencionado anteriormente no contiene más de 0.5% de extracto de levadura o autolisado de levadura para el período de conservación de por lo menos 30 días, en particular por lo menos 35 días, en particular por lo menos 40 días o hasta la fecha de uso del producto alimenticio fermentado mencionado anteriormente.

Además, el producto alimenticio fermentado mencionado anteriormente ya no contiene una cantidad mayor de 0.5% de extracto de levadura o autolisado de levadura durante el proceso para la preparación del producto y en particular al tiempo de la
5 inoculación de las bacterias y en toda la fermentación.

"Extracto de levadura" y "autolisado de levaduras" significa concentrados de compuestos solubles de células de levadura. A este respecto se puede hacer referencia en particular al artículo "Yeast extracts: production, properties and components" por Rolf
10 Sommer (9° Simposio Internacional sobre Levaduras), del cual la información a continuación es extraída.

Los extractos de levadura son producidos principalmente mediante autólisis, esto es, hidrólisis celular llevada a cabo sin la adición de otras enzimas. El extracto de levadura o
15 autolisado de levaduras son usados principalmente en la industria de fermentación y en la agroindustria alimenticia. La materia prima principal usada con el fin de producir el extracto de levadura está constituida por levaduras con una alta concentración de proteínas (cepas de *Saccharomyces cerevisiae*)
20 cultivadas en medio a base de molasas que está constituido por levaduras de cerveza desamargada (cepas de *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces uvarum*). Otras materias primas usadas son levaduras tales como *Kluyveromyces fragilis* (fermentado sobre lactosuero) o *Candida utilis* (cultivada sobre desperdicio rico en
25 carbohidratos que se origina en la industria de timber o etanol) y también cepas especiales de levaduras de panadero, con el fin de producir extracto de levadura que contiene 5'-nucleótidos.

La autólisis es el proceso de disociación más frecuentemente usado en la producción de extracto de levadura. Durante este
30 proceso, las levaduras son degradadas por sus propias enzimas

endógenas. El proceso de autólisis puede ser iniciado mediante un choque osmótico o temperatura controlada, que provoca la muerte celular sin inactivar las enzimas endógenas (en particular las proteasas). Un pH controlado, la temperatura y la duración de la autólisis son factores decisivos en un proceso de autólisis estandarizado. Al agregar sales o enzimas (por ejemplo, proteasas o mezclas de proteasas y peptidasas) en relación con la autólisis "estándar", la degradación de proteína de las células de levadura pueden ser controladas.

Además de la autólisis, el extracto de levadura puede ser producido mediante termólisis (por ejemplo, mediante ebullición de las levaduras en agua a 100°C), plasmólisis (tratamiento con soluciones salinas fuertes a una temperatura menor a 100°C) y degradación mecánica (homogenización a alta presión o molienda).

Luego los compuestos solubles son separados de las paredes celulares insolubles y concentrados con un evaporador en tanto que se agita o evaporador de película que cae, seguido por etapas opcionales de filtración, concentración bajo vacío parcial y esterilización rápida. Existen tres tipos de extractos de levadura: extracto de levadura líquida (materia seca: 50 a 65%); extracto de levadura tipo pasta viscosa (materia seca: 70 a 80%); polvo de extracto de levadura seco.

Tomando el ejemplo de un polvo de extracto de levadura estándar usado en la industria de fermentación, la composición es la siguiente:

Contenido de proteína:	73-75%
Sodio:	menos de 0.5%
Polisacáridos:	menos de 5%
Oligosacáridos:	menos de 1%
Lípidos:	menos de 0.5%

El contenido de proteína está comúnmente distribuido como sigue:

Aminoácidos libres	35-40%	5
Di, tri y tetrapéptidos (PM < 600 Da)	10-15%	
Oligopéptidos (PM de 2000-3000 Da)	40-45%	
Oligopéptidos (PM de 3000-10000 Da)	2-5%	

10 El contenido de cisteína típico es de 0.45% y el contenido de metionina típico es de 1.12% (1.08% en forma libre).

La invención es concerniente con el uso de por lo menos un aminoácido que contiene azufre, a una concentración total de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular de
15 aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular de aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l y en particular de aproximadamente 12.5 mg/l en forma libre, para la implementación de un proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado utilizando fermentos que contienen bifidobacterias,
20 tal producto alimenticio fermentado tiene propiedades organolépticas aceptables, contiene más de aproximadamente 5×10^7 , en particular más de aproximadamente 10^8 bifidobacterias por gramo de producto alimenticio fermentado para un período de conservación de por lo menos 30 días, en particular por lo menos
25 35 días y no contiene más de 0.5% de extracto de levadura o autolisado de levadura.

Además, la invención también es concerniente con un producto alimenticio fermentado, que tiene propiedades organolépticas aceptables, que contiene fermentos que comprenden más de
30 aproximadamente 5×10^7 , en particular más de aproximadamente 10^8

bifidobacterias por gramo de producto alimenticio fermentado para un período de conservación de por lo menos 30 días, en particular por lo menos 35 días y que tiene una concentración total de aminoácidos que contienen azufre en forma libre de
5 aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, en particular aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l y en particular 12.5
10 mg/l.

Más en particular, el producto alimenticio fermentado contiene fermentos que comprenden más de aproximadamente 5×10^7 , en particular más de aproximadamente 10^8 bifidobacterias por gramo de producto alimenticio fermentado para un período de
15 conservación de por lo menos 40 días o hasta la fecha de uso del producto alimenticio fermentado.

Ventajosamente, el producto alimenticio fermentado tal como se define anteriormente es de tal manera que la proporción del número de bifidobacterias contenidas en el producto alimenticio
20 fermentado al final del período de conservación al número de bifidobacterias contenidas en el producto alimenticio fermentado al inicio del período de conservación de por lo menos 30 días, en particular 35 días, es aproximadamente 0.2 a aproximadamente 0.8, aproximadamente 0.3 a aproximadamente 0.7, en particular
25 aproximadamente 0.4 a aproximadamente 0.5.

En otras palabras, la velocidad de supervivencia de las bifidobacterias contenidas en el producto alimenticio fermentado entre el inicio del período de conservación (esto es, el final del proceso de preparación) y el final del período de
30 preservación está comprendido entre 20 y 80%, en particular entre

30 y 70% y en particular entre 40 y 50%.

El período de conservación es de por lo menos 30 días, en particular por lo menos 35 días, pero más en particular por lo menos 40 días o se extiende por lo menos hasta la fecha de uso
5 del producto alimenticio fermentado.

La invención también es concerniente con un producto alimenticio fermentado conservado para un período de conservación de por lo menos 30 días, en particular por lo menos 35 días a una temperatura de aproximadamente 4 a aproximadamente 10°C, que
10 tiene propiedades organolépticas aceptables y que contiene fermentos que comprenden más de aproximadamente 5×10^7 , en particular más de 10^8 bifidobacterias por gramo de producto alimenticio fermentado.

Más en particular, la invención es concerniente con un
15 producto alimenticio fermentado conservado por un período de fermentación de por lo menos 30 días, en particular por lo menos 35 días, en particular por lo menos 40 días, a una temperatura de menos de 12°C o menos de 10°C, que tiene propiedades organolépticas aceptables y que contiene fermentos que comprenden
20 más de aproximadamente 5×10^7 , en particular más de aproximadamente 10^8 bifidobacterias por gramo de producto alimenticio fermentado.

Preferiblemente, la invención es concerniente con un producto alimenticio fermentado como se define anteriormente que
25 contiene aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, en particular aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l y en
30 particular 12.5 mg/l, de aminoácidos que contienen azufre y en

particular aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, en particular aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l y en particular 12.5 mg/l de cisteína y/o aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mg/l de metionina.

Con el fin de determinar la cisteína, es posible usar un analizador de aminoácidos tal como el Analizador de Aminoácidos de Alta Velocidad L-8800 (Hitachi High Technologies). Este analizador combina cromatografía de intercambio iónico con detección colorimétrica a dos longitudes de onda (570 y 440 nm) después de reacción con ninhidrina. También es posible usar cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas o cromatografía líquida de alto desempeño acoplada con detección fluorimétrica.

El uso más particular de cisteína es ventajoso ya que da elevación experimentalmente a un mejor efecto bifidogénico que la metionina.

El uso más particular de metionina es ventajoso ya que su costo es más bajo que el uso de la cisteína.

Ventajosamente, el producto alimenticio fermentado contiene menos de aproximadamente 0.5% (peso/peso) de sustancias que contienen más de aproximadamente 1.7% de aminoácidos libres que contienen azufre.

El producto alimenticio fermentado más en particular, contiene menos de aproximadamente 0.5% (peso/peso) de extracto de levadura y/o autolisado de levadura y/o leche, hidrolizado de proteína de planta o soya.

La presencia posible de extracto de levadura o sustancias tipo autolisado de levadura es detectable fácilmente en el producto mediante métodos conocidos. Por ejemplo, las bucanas o los plátanos proporcionados por estas sustancias son detectables.

5 Por ejemplo, las glucanas y mananas al ser fibras, es posible usar el método de determinación de fibra dietética total, recomendado por el AFSSA [Agencia Francesa para Seguridad de Alimentos] (método AOAC 985.29). La adición de extracto de levadura o una sustancia similar también debe dar como resultado
10 una modificación completa del contenido de todos los 20 aminoácidos en el producto, también como en una modificación de la concentración de vitaminas y minerales, en relación con la composición normal del producto (por ejemplo de leche, se puede hacer referencia particular al Manual de composición de leche,
15 1995, Academic Press).

De acuerdo con una modalidad preferida, las bifidobacterias contenidas en el producto alimenticio anterior son del tipo *Bifidobacterium animalis*, en particular *Bifidobacterium animalis animalis* y/o *Bifidobacterium animalis lactis* y/o *Bifidobacterium*
20 *breve* y/o *Bifidobacterium longum* y/o *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium bifidum*.

Ventajosamente, el producto alimenticio fermentado como se define anteriormente está basado en jugo de plantas y en particular jugo de frutas o jugo de vegetales tales como soya o
25 en un producto lácteo en particular leche de vaca y/o leche de cabra.

El producto alimenticio fermentado puede también estar basado en leche de oveja, leche de camello o leche de yegua.

Jugo de plantas significa un jugo producido a partir de
30 extracto de plantas, en particular soya, tonyu, trigo, maíz, etc.

Ejemplos de jugos vegetales son: jugo de tomate, jugo de remolacha, jugo de zanahoria, etc.

Ejemplos de jugos de fruta son: manzana, naranja, fresa, durazno, albaricoque, ciruela, frambuesa, zarzamora, grosella
5 silvestre, piña, limón, fruta cítrica, toronja, plátano, kiwi, pera, cereza, parquita, mango, jugo de fruta exótica, jugo de multifrutas, etc.

De acuerdo con una modalidad preferida, los fermentos del producto alimenticio fermentado como se definen anteriormente
10 contienen bacterias lácticas, en particular una o más bacterias del género *Lactobacillus* spp. y en particular *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* y/o *Lactobacillus casei* y/o *Lactobacillus reuteri* y/o *Lactobacillus acidophilus* y/o *Lactobacillus helveticus* y/o *Lactobacillus plantarum* y/o bacterias del tipo
15 *Lactococcus cremoris* y/o *Streptococcus thermophilus* y/o *Lactococcus lactis* y/o una o más bacterias del género *Leuconostoc*.

Ventajosamente, el producto alimenticio fermentado como se define anteriormente es de tal manera que la proporción de
20 bifidobacterias en los fermentos es de aproximadamente 20 a aproximadamente 80%, en particular aproximadamente 30 a aproximadamente 70%, en particular aproximadamente 40 a aproximadamente 60% y en particular aproximadamente 50%.

"Proporción de bifidobacterias en los fermentos" significa
25 la proporción de bifidobacterias en relación con el número total de bacterias incluidas en el producto alimenticio fermentado, esto es, en relación con todas las bifidobacterias y otras bacterias, en particular las bacterias *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, etc.

30 El buen equilibrio numérico entre las bifidobacterias y

otras cepas bacterianas en el producto alimenticio fermentado al final del proceso de preparación y el mantenimiento sustancial de este equilibrio en todo el período de conservación son garantías esenciales de la calidad del producto alimenticio.

5 Una proporción de 50% de bifidobacterias constituye una buena solución intermedia entre el problema de costo (las bifidobacterias son caras) y el problema de obtener una población correcta de bifidobacterias.

De acuerdo con una modalidad preferida, el producto
10 alimenticio fermentado como se describe anteriormente es presentado en forma de un producto alimenticio fermentado agitado o un producto alimenticio fermentado agitado o un producto alimenticio fermentado para beber o un producto alimenticio fermentado firme o un producto alimenticio fermentado para
15 infantes.

"Producto [...] agitado" significa un producto, en particular una leche, sembrada, fermentada, agitada mecánicamente y luego empacada. La fermentación de tal producto se lleva a cabo no en recipientes si no a granel en tanques. Luego la cuajada es
20 enfriada antes de ser empacada en recipientes, que son almacenados bajo refrigeración. La cuajada significa un coagulado de proteínas en particular de leche.

"[...] Producto para beber" significa un producto en forma sustancialmente líquida. Un producto para beber es un producto
25 que es, después de la etapa de agitación mecánica, el producto es batido en dos tanques antes de ser empacado.

"Producto [...] firme" significa un producto (en particular una leche) sembrada y empacada directamente en recipientes en donde fermenta. Después de la siembra, el producto es empacado en
30 recipientes. Estos recipientes son en general colocados en un

horno durante 3 horas. Las bacterias se reproducen y consumen la lactosa que es luego convertida parcialmente a ácido láctico que modifica la estructura de las proteínas, formando lo que es conocido como "gel láctico". Luego, los productos son colocados
 5 en un enfriador ventilado o túnel de enfriamiento y almacenados a aproximadamente 2-4°C.

"Producto [...] para infantes" significa un producto apropiado para las necesidades de los niños, con un bajo contenido de proteínas y grasas.

10 Tal producto alimenticio fermentado puede en particular ser un yogurt o un yogurt para beber firme, agitado para beber o una barra que contiene una sustancia láctea, kefir, un biscocho con un relleno lácteo, probióticos que contienen agua, etc.

Además, la invención también es concerniente con un proceso
 15 para la preparación de un producto alimenticio fermentado a partir de una sustancia de partida, que comprende:

→ una etapa de siembra de una sustancia de partida, opcionalmente pasteurizada, mediante inoculación con fermento de siembra que contienen bifidobacterias, con el fin de obtener una
 20 sustancia sembrada,

→ una etapa de fermentación de la sustancia sembrada obtenida en la etapa precedente con el fin de obtener una sustancia fermentada,

→ una etapa de incorporación de por lo menos un aminoácido
 25 que contiene azufre en forma libre a una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 75 mg/l en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, en particular
 30 aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular

77

aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l y en particular 12.5 mg/l, esta etapa de incorporación es apta de ocurrir:

→ ya sea antes de la etapa de siembra,

→ sustancialmente de manera simultánea por la etapa de
5 siembra, o

→ después de la etapa de siembra y antes de la etapa de fermentación,

a condición de que el producto alimenticio fermentado no contenga más de 0.5% (pero/peso) de extracto de levadura y/o autolisado de
10 levadura.

"Fermentación" significa una reacción bioquímica que involucra liberar energía de un sustrato orgánico, bajo la acción de microorganismos. Es un proceso de conversión de una materia prima mediante microorganismos, esta conversión produce luego
15 biomasa y metabolitos. En particular, la fermentación láctica es un proceso anaeróbico del consumo de lactosa por las bacterias en los fermentos, que provoca la producción de ácido láctico y una disminución del pH.

La invención se sigue del hallazgo sorprendente realizado
20 por los inventores de que la incorporación de aminoácidos que contienen azufre en los intervalos mencionados anteriormente, en ausencia de extracto de levadura y/o autolisado de levadura o la presencia de una baja concentración de los últimos, hace posible mejorar la resistencia de las bifidobacterias y su habilidad para
25 sobrevivir. Las bifidobacterias contenidas en el producto alimenticio fermentado al final del proceso de preparación de la invención está en el mejor estado fisiológico que si en la etapa de incorporación de aminoácidos que contienen azufre fueran omitidos, que permite un número más grande de estas
30 bifidobacterias sobrevivan durante la conservación del producto

alimenticio fermentado que sigue.

La cisteína y/o metionina tiene por consiguiente un efecto bifidogénico específico. Por otra parte, el uso de extracto de levadura y/o autolisado de levadura, en particular a 5 concentraciones mayores de 0.5% (peso/peso), tiene la tendencia de estimular todas las bacterias contenidas en el producto alimenticio fermentado, lo que puede conducir a un desequilibrio en la simbiosis bacteriana al perjuicio de las bifidobacterias y en favor en particular, si están presentes, de las bacterias 10 lácticas. Las consecuencias de este desequilibrio son una modificación del pH, una producción de ácido acético y/o H₂O₂, todos eventos de los cuales son perjudiciales para la calidad del producto.

Además, se debe notar que a partir de una concentración de 15 aminoácidos que contienen azufre mayores de 30 mg/l, en particular de una concentración de aminoácidos que contienen azufre mayor de 50 mg/l y más en particular de una concentración de aminoácidos que contienen azufre mayor de 75 mg/l, se nota una clara degradación de las propiedades organolépticas del producto 20 alimenticio. Esta degradación es notada por medio de una prueba de gusto estándar, como se describe anteriormente, que revela la existencia de un sabor de azufre capaz de hacer los productos inapropiados para consumo y comercialización. Se debe notar que el gusto de azufre desagradable ocurre en particular en el caso 25 de incorporación de cisteína y/o de metionina a más de 75 mg/l o aún en ciertos casos a más de 50 o 30 mg/l, pero también cuando las concentraciones de los aminoácidos que contienen azufre exceden tales valores debido a la presencia de sustancias adicionales, por ejemplo, extracto de levadura o autolisado de 30 levadura, en particular a un nivel de más de 0.5% (peso/peso).

79

Otra característica importante del proceso de la invención es que la incorporación de los fermentos que contienen las bifidobacterias se hace directamente en la sustancia de partida diseñada para convertirse en el producto alimenticio fermentado, sin recurrir necesariamente a medios de cultivo intermediarios artificiales/sintéticos.

De acuerdo con una modalidad particular, el proceso como se define anteriormente no comprende una etapa de adición de sustancias adicionales que contienen uno o más aminoácidos que contienen azufre.

De acuerdo con otra modalidad particular, el proceso como se define anteriormente comprende una etapa de adición de sustancias adicionales que contienen uno o más aminoácidos que contienen azufre en forma libre, la concentración de los aminoácidos que contienen azufre en forma libre en las sustancias adicionales es menor de 1.7%, preferiblemente menor de aproximadamente 0.5% y la concentración de las sustancias adicionales en el producto alimenticio fermentado es menor de aproximadamente 0.5%.

Más en particular, la etapa de adición de sustancias adicionales puede involucrar adición de un extracto de levadura y/o autolisado de levadura y/o hidrolizado de proteína de leche, planta o soya a una concentración de menos de aproximadamente 0.5% (peso/peso).

Preferiblemente, esta etapa de adición de sustancias adicionales toma lugar antes de la etapa de fermentación, por ejemplo, sustancialmente de manera simultánea con la etapa de siembra y/o simultáneamente con la etapa de incorporación de por lo menos un aminoácido que contiene azufre.

El beneficio de una adición sustancialmente de manera simultánea con la etapa de siembra y/o simultáneamente con la

etapa de incorporación de por lo menos un aminoácido que contiene azufre es de naturaleza práctica. En este caso, las sustancias tipo extracto de levadura adicionales son degradadas por lo menos parcialmente durante la fermentación, ya que sirven para
5 suministrar nutrientes a los fermentos. Así, la concentración de las sustancias tipo extracto de levadura adicionales varía durante la fermentación.

Ventajosamente, el proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado como se define anteriormente
10 también comprende una etapa de pasteurización que toma lugar antes de la etapa de siembra, haciendo posible obtener una sustancia de partida pasteurizada a partir de la sustancia de partida.

"Pasteurización" significa el método usual en el campo de
15 conservación de alimentos que involucra un calentamiento rápido sin ebullición, seguido por enfriamiento rápido, haciendo posible destruir la mayoría de las bacterias en tanto que conserva parcialmente las proteínas.

De acuerdo con una modalidad particular, la etapa de
20 incorporación de por lo menos un aminoácido que contiene azufre toma lugar antes de la etapa de pasteurización, el aminoácido que contiene azufre o ácidos que son incorporados a una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 75 mg/l, en particular
aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular
25 aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular
aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l y en particular 12.5 mg/l.

El beneficio de incorporación antes de la etapa de pasteurización es de naturaleza práctica.

30 De acuerdo con otra modalidad particular, la etapa de

incorporación de por lo menos un aminoácido que contiene azufre toma lugar sustancialmente de manera simultánea con la etapa de siembra, el aminoácido que contiene azufre o ácido son incorporados a una concentración de aproximadamente 5 a 5 aproximadamente 50 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, en particular aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l y n particular 12.5 mg/l.

10 El beneficio de incorporación sustancialmente simultánea con la etapa de siembra es de naturaleza económica (el aminoácido que contiene azufre o ácidos no son destruidos parcialmente por cualquier tratamiento térmico o pasteurización antes de la siembra) y de naturaleza práctica.

15 De acuerdo con otra modalidad particular, la etapa de incorporación de por lo menos un aminoácido que contiene azufre toma lugar después de la etapa de siembra y antes de la etapa de fermentación, el aminoácido que contiene azufre o ácido son incorporados a una concentración de aproximadamente 5 a 20 aproximadamente 50 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, en particular aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l y en particular 12.5 mg/l.

25 El beneficio de incorporación después de la etapa de siembra y antes de la etapa de fermentación es de naturaleza práctica y asegura una supervivencia incrementada de las bifidobacterias durante el almacenamiento del producto.

30 Se debe notar que en el caso en donde la incorporación del aminoácido que contiene azufre o ácido toma lugar antes de la

etapa de pasteurización, la cantidad de aminoácidos que contienen azufre a ser incorporados debe ser incorporada por aproximadamente 30 a 50% con respecto al caso en donde de esta incorporación toma lugar después de la etapa de pasteurización
5 opcional, esto es, en particular sustancialmente de manera simultánea con la etapa de siembra o después de la etapa de siembra. En efecto, en el primer caso algunos de los aminoácidos que contienen azufre son destruidos durante la pasteurización.

En otras palabras, la parte superior del intervalo de
10 concentración para aminoácidos que contienen azufre de 50-75 mg/l que está incluido en el intervalo de concentración para aminoácidos que contienen azufre provistos en esta invención se relaciona más específicamente al caso en donde la incorporación de los aminoácidos que contienen azufre toman lugar antes de una
15 etapa de pasteurización.

Se debe notar que es posible contemplar dividir la etapa de incorporación de aminoácidos que contienen azufre en dos o más sub-etapas, que pueden opcionalmente ocurrir a tiempos diferentes en el proceso de acuerdo con la invención. La concentración de
20 los aminoácidos que contienen azufre que es indicada anteriormente corresponde entonces a la concentración total de los aminoácidos que contienen azufre al final de las diferentes sub-etapas de incorporación de aminoácidos que contienen azufre.

De acuerdo con una modalidad preferida, el proceso para la
25 preparación de un producto alimenticio fermentado como se define anteriormente comprende una etapa de adición de una preparación intermediaria simultáneamente con la etapa de siembra o entre la etapa de siembra y la etapa de fermentación para obtener, a partir de la sustancia sembrada, una sustancia sembrada completa
30 o después de la etapa de fermentación, para obtener, a partir de

la sustancia fermentada, una sustancia fermentada completa, la preparación intermediaria comprende una preparación de frutas y/o cereales y/o aditivos tales como suavizantes y colorantes y la etapa de adición de una preparación intermediaria puede tomar
5 lugar simultáneamente con la etapa de incorporación de por lo menos un aminoácido que contiene azufre.

La preparación intermediaria puede en particular contener espesantes (fibras solubles e hidrosolubles, alginato, carragenanos, goma xantana, pectina, almidón, en particular
10 gelatinizado, goma gelana, celulosa y sus derivados, goma guar y de caroba, inulina) o endulzantes (aspartame, acesulfame K, sacarina, sucralosa, ciclamato) o conservadores.

Ejemplos de saborizantes son: manzana, naranja, fresa, fruta de kiwi, saborizantes de cocoa, etc.

15 Ejemplos de colorantes son: beta-caroteno, carmina, rojo de cochineal.

Además, la preparación de las frutas mencionadas anteriormente puede comprender frutas que son enteras o en piezas o en gelatina o en mermelada, haciendo posible obtener un por
20 ejemplo, yogurt de fruta.

La preparación intermediaria puede también contener extractos de planta (soya, arroz, etc.).

De acuerdo con otra modalidad de la invención, la etapa de siembra comprende inoculación con fermentos de siembra que
25 contienen aproximadamente 10^6 a aproximadamente 2×10^8 , más en particular aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7 bifidobacterias por ml (o por gramo) de sustancia de partida.

Si la cantidad de bifidobacterias mayor que este intervalo es inoculada, se pueden desarrollar gustos tipo ácido acético
30 indeseables. Si una cantidad de bifidobacterias menor que este

84

intervalo es inoculada, la cantidad final de bifidobacterias es insuficiente.

Ventajosamente, en el proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de acuerdo con la invención, las
5 bifidobacterias son escogidas de bacterias del tipo *Bifidobacterium animalis*, en particular *Bifidobacterium animalis animalis* y/o *Bifidobacterium animalis lactis* y/o *Bifidobacterium breve* y/o *Bifidobacterium longum* y/o *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium bifidum*.

10 Particularmente de preferencia, en el proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de acuerdo con la invención, las bifidobacterias son escogidas de bacterias del tipo *Bifidobacterium animalis*.

Ventajosamente, en el proceso para la preparación de un
15 producto alimenticio fermentado de acuerdo con la invención, los fermentos de siembra contienen bacterias lácticas, en particular una o más bacterias del género *Lactobacillus spp.* y en particular *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* y/o *Lactobacillus helveticus* y/o *Lactobacillus plantarum* y/o bacterias del tipo *Lactococcus*
20 *cremoris* y/o *Streptococcus thermophilus* y/o *Lactococcus lactis* y/o una o más bacterias del género *Leuconostoc*.

De acuerdo con una modalidad ventajosa del proceso para la preparación de un proceso alimenticio fermentado como se define anteriormente, la proporción de bifidobacterias en los fermentos
25 de siembra es de aproximadamente 20 a aproximadamente 75%, en particular aproximadamente 30 a aproximadamente 50%, en particular aproximadamente 35 a aproximadamente 40%, en particular aproximadamente 37.5.

"Proporción de las bifidobacterias en los fermentos de
30 siembra" significa la proporción de bifidobacterias en relación

AS

con todas las bacterias inoculadas en total durante la etapa de siembra.

Esta proporción corresponde a un óptimo en términos de costo y concentración final de bifidobacterias, dada que la
5 concentración más alta de bifidobacterias al inicio, más competitivo son en términos de crecimiento relativo a otras cepas en los fermentos y más rápidamente se alcanza la concentración óptima de bifidobacterias.

De acuerdo con una modalidad preferida del proceso para la
10 preparación de un producto alimenticio fermentado como se define anteriormente, la sustancia de partida está basada en jugo de plantas y en particular jugo de frutas o jugo de vegetales tal como jugo de soya o en un producto lácteo y en particular leche de vaca y/o leche de cabra.

15 La sustancia de partida puede también comprender leche de oveja y/o camello y/o yegua.

En el caso en donde el producto alimenticio fermentado es un producto lácteo, la sustancia de partida puede comprender leche, polvo de leche, azúcar, una mezcla de leche y jugo de planta, una
20 mezcla de leche y jugo de frutas, una mezcla de leche y almidón.

Ventajosamente, el proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de acuerdo con la invención es de tal manera que la sustancia de partida pasteurizada es una sustancia de partida pasteurizada, que es mantenida,
25 opcionalmente homogenizada y enfriada, obtenida de una materia prima, el proceso comprende, antes de la etapa de siembra, las siguientes etapas sucesivas:

→ una etapa de estandarización de sustancias grasas de las materias primas para obtener una sustancia estandarizada,

30 → una etapa de enriquecimiento con materia seca de

sustancia estandarizada obtenida de la etapa precedente para obtener una sustancia enriquecida,

→ una etapa de precalentamiento de la sustancia enriquecida obtenida de la etapa precedente para obtener una sustancia de
5 partida,

→ una etapa de pasteurización y retención de las sustancias de partida obtenida en la sustancia precedente para obtener una sustancia pasteurizada y retenida,

→ una etapa opcional de homogenización de la sustancia
10 pasteurizada y retenida obtenida en la etapa precedente, para obtener una sustancia pasteurizada, retenida y opcionalmente homogenizada,

→ una etapa de enfriamiento inicial de la sustancia pasteurizada, retenida y opcionalmente homogenizada obtenida en
15 la etapa precedente, para tener una sustancia de partida pasteurizada, mantenida, opcionalmente homogenizada y enfriada.

"Estandarización de sustancias grasas" significa una etapa de traer la cantidad de grasas presentes en la sustancia de partida a un nivel predeterminado.

20 El enriquecimiento con materia seca involucra la adición de proteínas y sustancia grasa con el fin de modificar la dureza de la cuajada.

"Retención" involucra una termización rápida de la leche y hace posible destruir la flora microbiana vegetativa, en las que
25 se incluyen formas patógenas. Su duración típica es de 4 a 10 minutos, en particular de 5 a 8 minutos y en particular aproximadamente 6 minutos.

"Homogenización" significa la dispersión de las sustancias grasas de la sustancia tipo leche en glóbulos de grasa pequeños.
30 La homogenización se lleva a cabo por ejemplo, a una presión de

100 a 280 bars, en particular 100 250 bars, en particular 100 a 200 bars, en particular aproximadamente 200 bars. Esta etapa de homogenización es puramente opcional. Está en particular ausente del proceso de producción de productos con 0% de sustancias
5 grasas.

De acuerdo con una modalidad particular, el proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado como se define anteriormente comprende una etapa de empaque entre la etapa de siembra y la etapa de fermentación, la etapa de empaque hace
10 posible obtener, a partir de la sustancia sembrada obtenida en la etapa de siembra, una sustancia sembrada y empacada.

Esta modalidad particular corresponde al caso de los productos alimenticios fermentados tipo firme.

Más en particular, el proceso para la preparación de un
15 producto alimenticio fermentado como se describe anteriormente comprende:

- una etapa de siembra de una sustancia de partida, opcionalmente pasteurizada, mediante inoculación de fermentos de siembra que contienen aproximadamente 10^6 a aproximadamente 2×10^8 bifidobacterias, más en particular aproximadamente 10^6 a
20 aproximadamente 10^7 bifidobacterias por ml de sustancia de partida, con el fin de obtener una sustancia sembrada,

- una sustancia de empaque de la sustancia sembrada obtenida en la etapa precedente, con el fin de obtener una sustancia
25 sembrada empacada,

- una etapa de fermentación de la sustancia sembrada empacada obtenida en la etapa precedente, de tal manera que la temperatura al inicio de la fermentación es aproximadamente 36 a aproximadamente 43°C, en particular aproximadamente 37 a
30 aproximadamente 40°C, la temperatura al final de la fermentación

es de aproximadamente de 37 a aproximadamente 44°C, en particular aproximadamente de 6 a aproximadamente 11 horas, con el fin de obtener una sustancia fermentada,

- una etapa de enfriamiento final de la sustancia fermentada obtenida en la etapa precedente, de tal manera que la temperatura al inicio del enfriamiento final es menor de aproximadamente 22°C y la temperatura al final del enfriamiento final es de aproximadamente 4 a aproximadamente 10°C, para obtener un producto alimenticio fermentado.

10 De acuerdo con una modalidad alternativa, que no involucra la preparación de un producto tipo firme, el proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de acuerdo con la invención comprende con las siguientes etapas sucesivas después de la etapa de fermentación:

- 15 - una etapa de enfriamiento intermedia de la sustancia fermentada obtenida en la etapa de fermentación, para obtener una sustancia pre-enfriada,

- una etapa de almacenamiento de la sustancia pre-enfriada obtenida en la etapa precedente, para obtener una sustancia almacenada,

- 20 - una etapa de enfriamiento final de la sustancia almacenada obtenida en la etapa precedente, para obtener un producto alimenticio fermentado.

De acuerdo con una modalidad preferida, la etapa de fermentación es de tal manera que la temperatura al inicio de la fermentación es de aproximadamente 36 a aproximadamente 43°C y en particular aproximadamente de 37 a aproximadamente 40°C, la temperatura al final de la fermentación es de aproximadamente de 37 a aproximadamente 44°C y en particular aproximadamente de 38 a aproximadamente 41° y el tiempo de fermentación es de

aproximadamente 6 a aproximadamente 11 horas.

Ventajosamente, la etapa de enfriamiento intermedia es de tal manera que el tiempo de enfriamiento intermedio es de aproximadamente una hora a aproximadamente 4 horas y en particular una hora 30 minutos a aproximadamente 2 horas y la temperatura de enfriamiento intermedia es de aproximadamente 4 a aproximadamente 22°C.

Preferiblemente, la etapa de almacenamiento es de tal manera que el tiempo de almacenamiento es menor o igual que aproximadamente 40 horas.

Ventajosamente, la etapa de enfriamiento final es de tal manera que la temperatura al inicio del enfriamiento final es menor que aproximadamente 22°C y la temperatura al final del enfriamiento final es de aproximadamente 4 a aproximadamente 10°C.

De acuerdo con una modalidad preferida, el proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de acuerdo con la invención comprende:

- una etapa de siembra de una sustancia de partida, opcionalmente pasteurizada, mediante inoculación con fermentos de siembra que contienen 10^6 a aproximadamente 2×10^8 , más en particular aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7 bifidobacterias por ml (o por gramo) de sustancia de partida con el fin de obtener una sustancia sembrada,
- una etapa de fermentación de la sustancia sembrada obtenida en la etapa precedente, de tal manera que la temperatura al inicio de la fermentación es de aproximadamente 36 a aproximadamente 43°C, en particular aproximadamente 37 a aproximadamente 40°C, la temperatura al final de la fermentación es de aproximadamente 37 a aproximadamente 44°C, en particular

aproximadamente 38 a aproximadamente 41°C y el tiempo de fermentación es de aproximadamente 6 a aproximadamente 11 horas, con el fin de obtener una sustancia fermentada,

- una etapa de enfriamiento intermedio de la sustancia fermentada obtenida en la etapa precedente, de tal manera que el tiempo de enfriamiento intermedio es de aproximadamente una hora a aproximadamente 4 horas, en particular una hora 30 minutos a aproximadamente 2 horas y la temperatura de enfriamiento intermedia es de aproximadamente 4 a aproximadamente 22°C, para obtener una sustancia pre-enfriada,

- una etapa de almacenamiento de la sustancia pre-enfriada obtenida en la etapa precedente, de tal manera que el tiempo de almacenamiento es menor o igual que aproximadamente 40 horas, para obtener una sustancia almacenada,

- una etapa de enfriamiento final de la sustancia almacenada obtenida en la etapa precedente, de tal manera que la temperatura al inicio del enfriamiento final es menor de aproximadamente 22°C y la temperatura al final del enfriamiento final es de aproximadamente 4 a aproximadamente 10°C para obtener un producto alimenticio fermentado.

De acuerdo con una modalidad particular del proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado como se describe anteriormente, se proporciona una etapa de agitación adicional entre la etapa de fermentación y la etapa de enfriamiento intermedia, haciendo posible obtener a partir de la sustancia fermentada obtenida en la etapa de fermentación, una sustancia fermentada agitada.

"Agitación" significa un proceso de agitación mecánica utilizando una turbina o agitador helicoidal. Es una etapa que determina la untuosidad del producto en particular el producto

lácteo. Si la agitación es demasiado violenta, la incorporación de aire y separación del suero puede ocurrir. Si la agitación es insuficiente, el producto tiene riesgo de volverse subsecuentemente demasiado espeso.

5 De acuerdo con una modalidad particular, el proceso para la preparación de un proceso alimenticio fermentado de acuerdo con la invención comprende, después de la etapa de enfriamiento final, una etapa de conservación de producto alimenticio fermentado a una temperatura comprendida entre aproximadamente 4
10 y aproximadamente 10°C.

La invención también es concerniente con un producto alimenticio fermentado tal como es obtenido a partir del proceso como se define anteriormente.

15

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** representa una comparación del efecto de cisteína y vitamina C sobre la acidificación de leche por el fermento del Ejemplo 1. El tiempo en minutos es mostrado a lo largo del eje x, el pH a lo largo del eje y. Curva A: control sin
20 vitamina C o cisteína; Curva B: vitamina C; Curva C: cisteína.

La **Figura 2** representa el desarrollo de la población de bifidobacterias en el modelo de control durante la conservación a 10°C. A lo largo del eje x, el tiempo de conservación en días; a lo largo del eje y, la población de bifidobacterias es UFC/ml. ■:
25 con 15 mg/l de cisteína filtrada; ▲: sin cisteína.

La **Figura 3** representa el desarrollo de la población de bifidobacterias en la leche como función del tratamiento del estimulante. Eje X: tiempo de conservación en días; eje y: población en UFC/ml. Condiciones: ■, control sin cisteína o
30 metionina; ●, cisteína filtrada; □, metionina sometida a

autoclave; curva discontinua, metionina filtrada.

La **Figura 4** representa el monitoreo de la población de bifidobacterias en el modelo de control durante conservación a 10°C. Eje X: tiempo de conservación en días; eje y: población en UGC/ml. ■, cisteína a 12 mg/l incorporado antes de la pasteurización; ▲:, control sin cisteína.

Ejemplos

10 Ejemplo 1: Estudio del modo de acción de cisteína como estimulante

Un fermento que comprende *Streptococcus thermophilus* (CNCM: I-1630) + *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (CNCM: I-1632) + *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* (CNCM: I-1519) + *Bifidobacterium animalis ssp lactis* (CNCM: I-2494) es usado.

15 Este ejemplo involucra el estudio del modo de acción de cisteína como estimulante y determinación de que tiene un efecto metabólico antioxidante.

El crecimiento de bifidobacterias en leche es medido en presencia de una solución de vitamina C (0.5 g/l), que reduce
20 completamente el oxígeno en el medio y una solución de cisteína (50 mg/l).

Constitución del modelo de producto:

Polvo de leche descremada Milex suministrada por Arla food:
25 120 g

Agua cantidad suficiente para 1 kg

Un tratamiento térmico se lleva a cabo que involucra pasteurización durante 30 minutos a 25°C en un baño de agua burbujeante.

30 La cisteína es suministrada por Sigma. La solución es

preparada a 500 g/l, filtrada sobre una unidad de filtro Nalgène de 0.2 µm. Esta solución es usada inyectada estérilmente al modelo pasteurizado para una concentración final de 50 mg/l.

La vitamina C es suministrada por Sigma. La solución es preparada a 100 g/l, filtrada sobre una unidad de filtro Nalgène de 0.2 µm (cat. 156-4020, Nalge Europe Ltd, Bélgica). Esta solución es usada inyectada estérilmente al modelo pasteurizado para una concentración final de 0.5 g/l.

Las dosis de siembra del modelo de producto son dadas en la Tabla 1 que sigue.

Tabla 1. Dosis de siembra

Volumen por 1 pulgada en µl			
	Control	Cisteína filtrada	Vitamina C
I-1630	100	100	100
I-1519 + I-1632	220	220	220
I-2494	190	190	190
Cisteína		100	
Vitamina C			5 ml

9A

5

La siembra es de 5×10^6 UFC/ml de Streptococcus thermophilus y 5×10^6 UFC/ml de Lactobacillus bulgaricus.

El monitoreo de la acidificación del modelo a 37°C es representado en la Tabla 2 a continuación también como en la Figura 1.

Tabla 2: Monitoreo de la acidificación del modelo

15

	Vitamina C	Cisteína filtrada	Control
Ta	86	90	83
Vmax	-0.0079	-0.01046	-0.00791
pHm	5.96	5.82	6.06
Tmax	184	208	180
pH0	6.5	6.6	6.7
TpH 5.5	260	248	270
TpH 5	391	354	412
TpH 4.8	479	417	506
DO UFC/ml	102×10^8	2.79×10^8	1.47×10^8

20

25

Ta = tiempo de latencia (en minutos)

30

95

Vmax = Velocidad máxima (en unidades pH/minuto)

Tmax = Tiempo a Vmax (en minutos)

pHm = pH a la proporción de acidificación máxima

TpH 5.5 = Tiempo para llegar al pH 5.5 (en minutos)

5 TpH 5 = Tiempo para llegar al pH 5. (en minutos)

TpH = Tiempo para llegar al pH 4.8 (en minutos)

D0 UFC/ml = cantidad de bifidobacterias obtenidas al final de la fermentación.

Se notará que la curva de acidificación en presencia de
 10 cisteína requiere de la curva de acidificación en presencia de
 vitamina C, que es por sí mismo virtualmente indistinguible de la
 curva de acidificación de control sin vitamina C o cisteína. Dado
 que la vitamina C es un amplio oxidante, se deduce que éste tiene
 el efecto estimulante de cisteína no es un efecto antioxidante si
 15 no que es más ciertamente un efecto de proporcionar aminoácido
 esencial.

Ejemplo 2: Determinación de la dosis estimulante de cisteína

Se usa un fermento que comprende *Streptococcus thermophilus*
 20 (CNCM: I-2272) + *Streptococcus thermophilus* (CNCM: I-2773) +
Streptococcus thermophilus (CNCM: I-2130) + *Lactobacillus*
delbrueckii ssp. bulgaricus (CNCM: I-1519) + *Bifidobacterium*
animalis ssp lactis (CNCM: I-2494).

"Modelos de leche" están constituidos por yogures agitados
 25 estándar que comprenden el fermento descrito anteriormente.

Se determina que el uso de cisteína filtrada de 0.2 µm en
 los "modelos de leche" en proporciones consisten de 5 mg/l a 50
 mg/l (preferiblemente de 5 a 20 mg/l).

Para el método de conteo de bifidobacterias, se puede hacer
 30 referencia a M. Grand et al., Quantitative analysis and molecular

identification of bifidobacteria strains in probiotic milk products, Eur. Food Res. Technol. 217:90-92 (2003).

la población de bifidobacterias para la prueba que contiene la concentración más alta de L-cisteína es 3×10^8 UFC/ml a D+24 h, D correspondiente al tiempo de empaque del producto y permanece estable después de la conservación por hasta 28 días a 10°C . la población de control estándar (población de control D0: 1×10^8 UFC/ml) es de 9×10^7 UFC/ml a 28 días de conservación a 10°C .

La población de bifidobacterias para la prueba que contiene la concentración más baja de L cisteína es 1×10^8 CFU/ml a D+24h.

Ciertos productos tienen un gusto indeseable caracterizado por una nota de azufre que puede ser detectada a partir de 0.002% de cisteína agregada. Por debajo de esta concentración de cisteína los productos son aceptados: una dosis de 0.0015% representa una buena solución intermedia entre las recepciones organolépticas y restricciones en términos de una población de *Bifidobacterium* $> 2 \times 10^8$ UFC/ml.

Pruebas de crecimiento sobre leche llevadas a cabo en presencia de 0.0015%, esto es, 15 mg/l de cisteína filtrada han hecho posible alcanzar una población I-2494 de bifidobacterias de 2×10^8 UFC/ml después de 28 días de conservación a 10°C (el desarrollo de la población en relación con el control sin cisteína es representado en la Figura 2).

A partir de un punto de vista de análisis sensorial, los productos producidos no tienen un gusto indeseable detectable en comparación con el estándar.

Ejemplo 3: Cinética de acidificación

Se usa el fermento descrito en el Ejemplo 2.

La cinética de acidificación de leche en presencia (15 mg/l) de la dosis óptima de cisteína y la ausencia de cisteína (control) muestran la ausencia del efecto de la cisteína sobre la cinética global.

Ejemplo 4: Efecto del tipo de tratamiento del aminoácidos que contiene azufre

10 El impacto de esterilización mediante filtración o termización de la cisteína y metionina es determinado (concentración final usada: 50 mg/l).

Las soluciones son ya sea filtradas a 0.2 μm o sometidas a autoclave durante 5 minutos a 121°C luego congeladas en forma de 15 perlas en nitrógeno líquido.

Constitución del modelo:

Leche en polvo descremada Milex suministrada por Arla food:
120 g

20 Agua: cantidad suficiente para 1 kg.

Tratamiento térmico: pasteurización durante 30 minutos a 25°C en un baño de agua burbujeante.

Cisteína: proveedor Sigma. La solución es preparada a 500 g/l, filtrada sobre una unidad de filtro Nalgène de 0.2 μm o 25 esterilizada a 121°C durante 5 minutos mediante una autoclave controlada por sonda de temperatura (Fetinge France S.A., referencia KL 60/101). Esta solución es inyectada estérilmente al modelo pasteurizado para una concentración final de 50 mg/l.

Metionina: proveedor Sigma. La solución es preparada a 300 30 g/l; la filtración o tratamiento de esterilización es idéntico a

aquel llevado a cabo para la solución de cisteína. Esta solución es inyectada estérilmente al modelo pasteurizado para una concentración final de 50 mg/l.

Las dosis de siembra son referidas en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Dosis de siembra

	Volumen de 1 l en µl				
	Control	Cisteína filtrada	Cisteína sometida a autoclave	Metionina filtrada	Metionina sometida a autoclave
I-1630	100	100	100	100	100
I-1519 + I-1632	220	220	220	220	220
I-2494	95	95	95	95	95
Cisteína filtrada		100			
Cisteína sometida a autoclave			100		
Metionina filtrada				100	
Metionina sometida a autoclave					100

La siembra es de 5 x 10⁶ UFC/ml de Streptococcus thermophilus y 5 x 10⁶ UFC/ml de Lactobacillus bulgaricus.

El monitoreo de la población de bifidobacterias en el modelo conservado a 4°C como función de las varias condiciones anteriores es representado en la Figura 3 también como en la Tabla 4 a continuación:

Tabla 4: Desarrollo de la población de bifidobacterias

	D0 UFC/ml	D10 UFC/ml	D24 UFC/ml	D29 UFC/ml
Cisteína filtrada	5.1 x 10 ⁸	4.3 x 10 ⁸	4.0 x 10 ⁸	2.3 x 10 ⁸
Cisteína sometida a autoclave	3.1 x 10 ⁸	5.2 x 10 ⁸	2.8 x 10 ⁸	1.7 x 10 ⁸
Metionina filtrada	4.0 x 10 ⁸	6.2 x 10 ⁸	3.4 x 10 ⁸	2.3 x 10 ⁸
Metionina sometida a autoclave	3.4 x 10 ⁸	3.5 x 10 ⁸	3.5 x 10 ⁸	2.8 x 10 ⁸
Control	1.7 x 10 ⁸	7 x 10 ⁷	5 x 10 ⁷	2 x 10 ⁷

El tiempo de referencia D0 corresponde a la colocación de recipientes (empaque). Las mediciones D10, D24, D29 se llevan a cabo 10 días, 24 días, 29 días respectivamente después de esta colocación en recipientes.

5 En todos los casos, la población de bifidobacterias es incrementada por el suministro de cisteína o metionina. Ningún efecto de tratamiento térmico sobre la efectividad de los estimulantes se puede observar bajo las condiciones de prueba. El tratamiento térmico aplicado a la cisteína a 50 mg/l degrada solo
10 una parte de la misma, la concentración residual (no determinada) es suficiente para mejorar la población de bifidobacterias.

15 Ejemplo 5: Desarrollo de la población de bifidobacterias durante la incorporación del caso de incorporación de cisteína antes de la pasteurización

La dosis de 12 mg/l de cisteína es definida por tener efecto estimulante que responde a la población objetivo (2×10^8 UFC/ml)
20 y responde positivamente en términos organolépticos) ninguna diferencia detectable). Esta concentración fue determinada sobre la incorporación directa en el modelo y composición pasteurizada (95°C, 30 minutos).

El monitoreo de la población de bifidobacterias en el modelo
25 de producto durante la conservación a 10°C es representado en la Figura 4.

La población de *Bifidobacterium* es de 2.4×10^8 UFC/ml en D1 (esto es, 24 horas de almacenamiento) y sigue siendo estable después de 44 días de conservación a 10°C (por encima de $1.4 \times$
30 10^8 UFC/ml). El efecto estimulante es claramente demostrado en

relación con el control estándar (1.6×10^8 UFC/ml en D1; 7.65×10^7 UFC/ml en D8; 2×10^8 UFC/ml en D28; 1.8×10^8 UFC/ml en D35; 8.5×10^8 UFC/ml en D44) bajo estas condiciones: la población a D0 es más alta cuando se usan los aminoácidos que contienen azufre y el mantenimiento de la población durante la vida del producto es mucho muy mejorada. Sin embargo, este efecto estimulante sigue siendo menos efectivo que la adición de cisteína filtrada de $0.2 \mu\text{m}$ al modelo (3×10^8 UFC/ml), el tratamiento térmico da como resultado una degradación de la cisteína (concentración residual menor de 15 mg/l). Se proporcionará una sobredosis inicial de la cantidad de cisteína en el caso en donde la cisteína sufre un tratamiento térmico.

Conclusiones concernientes con las condiciones de utilización de cisteína:

- 15 - la utilización de cisteína filtrada directamente (con el fermento) conserva la cisteína;
- su adición a la composición del modelo tratado térmicamente produce un resultado ligeramente menos bueno en términos de población pero debe tomar en cuenta la degradación de la cisteína durante el tratamiento térmico (menos disponible);
- 20 - su adición vía ingrediente lácteo tratado térmicamente (por ejemplo, glicomacropéptido correspondiente al fragmento 106-169 de kappa caseína) produce resultados menos buenos (menos disponibles);
- 25 - su adición en forma congelada al fermento es posible.

Ejemplo 6: Producción de un yogurt agitado graso de acuerdo con la invención a escala de laboratorio (micro-producción)

1. Composición de la leche y rehidratación

30 El yogurt agitado comprende los siguientes ingredientes:

pl

leche descremada con 0% de grasa, crema con 405 de grasa y leche en polvo descremada con 33% de proteínas.

En primer lugar, todos los ingredientes son combinados conjuntamente con el fin de estabilizar la leche a un nivel de 5 proteína (PL= de 4.4%, un nivel de grasa de 3.5% (FL) y un nivel de materia seca de 15.8% con agitación del medio durante 60 minutos a aproximadamente 750 rpm con un agitador HEIDOLPH® con el fin de que las proteínas se rehidraten.

El control de la estandarización se lleva a cabo con un 10 detector infrarrojo MILKOSCAN FT 120® de Foss®. A continuación, un ejemplo de las cantidades necesarias de cada ingrediente con el fin de obtener los objetivos que caracterizan la leche.

Ingredientes	En %
Leche descremada 0% grasa	87.5
15 Crema con 40% de grasa	8.7
Proteínas con leche descremada 33 % PL	3.8
TOTAL	100

2. Homogenización

20 Luego la leche es calentada entre 50°C y 60°C con el fin de fundir los glóbulos de grasa. Una vez que se alcanza la temperatura, los 10 litros son homogenizados con un MICROFLUIDIZADOR® de MICROCORPS®. Esto hace posible romper los glóbulos de grasa al hacer pasar la leche capilar a través de una 25 arcilla bajo una presión de 350 bars.

3. Pasteurización

Se prepara un baño de agua A MEMMERT® y es ajustado a 103°C. La leche es transferida a ocho botellas de un litro, con una 30 pesada precisa de esa cantidad para cada botella.

(12)

Las botellas son sumergidas en el baño de agua hasta el fondo del cuello a 103°C durante 35 minutos, luego 10 minutos a 95°C en el mismo baño de agua.

5 **4. Enfriamiento y almacenamiento**

Las botellas son enfriadas en un baño de agua fría con un flujo continuo, luego almacenadas a 4°C en un refrigerador por 12 a 24 horas de acuerdo con el programa de pruebas contemplado.

10 **5. Retención**

Las botellas de leche son removidas del refrigerador 45 minutos antes de la inoculación de los fermentos y colocadas en un baño de agua a una temperatura de fermentación considerada, esto es, 37°C.

15

6. Fermentación

Después de la inoculación de los fermentos (5×10^6 UFC/ml de *Streptococcus thermophilus*; 5×10^6 UFC/ml de *Lactobacillus bulgaricus*; 5×10^6 UFC/ml de bifidobacterias) y L-cisteína (15 mg/l) a la temperatura de fermentación de 37°C, las botellas son re-sumergidas en el baño de agua y la acidificación es monitoreada mediante un CINAC® de YSEBAERT® hasta un pH de 4.8.

7. Corte de coágulo y suavización

El coágulo en la botella es cortado manualmente. El yogurt con coágulo cortado es vertido a la tolva de la plataforma de suavización. La suavización toma lugar vía una rejilla de metal con una porosidad de 500 micras y el producto suavizado es enfriado a 20°C vía un circuito de intercambio en agua helada.

30 **8. Empaque y almacenamiento**

El empaque se lleva a cabo manualmente en recipientes de 125 ml y la tapa es sellada térmicamente con un sellador térmico DNV-100-25 PPV-A® de FESTO®. Los productos son almacenados en un enfriador a 10°C en toda la prueba.

Ejemplo 7. Determinación de la dosis de cisteína a ser agregada con el fin de obtener un producto con buena calidad organoléptica y que contiene la población objetivo de bifidobacterias

Diferentes productos fueron preparados con dosis incrementadas de cisteína (véase la tabla a continuación).

El control fue el producto lácteo estándar que contiene el fermento.

Intervalo:

Volumen/1L	Dosis de cisteína	
3.2 ml	0.0080%	80 mg/l
2 ml	0.0050%	50 mg/l
0.8 ml	0.0020%	20 mg/l
0.4 ml	0.0010%	10 mg/l
0.2 ml	0.0005%	5 mg/l

Cada producto fue probado por cuatro individuos que estaban muy familiarizados con el producto de referencia desde un punto de vista organoléptico. Estos individuos dieron sus opiniones en términos de la presencia de malos gustos (gusto a azufre, nota ácida), la referencia es el producto estándar que no contiene cisteína.

104

5

Resultados				
Prueba	Poblaciones (UFC/ml)			Determinación sensorial (n = 4)
Tiempo	T0	T pH4.8	Tf 495 min	
1	4.40 x10 ⁶	/	1.7 x10 ⁶	Sabor a azufre y/o nota ácida detectada por todos los gustadores
0.008%				
2	4.70 x10 ⁶	1.90 x10 ⁶	2.40 x10 ⁶	Sabor a azufre y/o nota ácida detectada por todos los gustadores
0.005%				
3	3.30 x10 ⁶	2.50 x10 ⁸	3.10 x10 ⁸	Sabor a azufre y/o nota ácida detectada por todos los gustadores
0.002%				
4	/	/	/	Sabor a azufre y/o nota ácida detectada por todos los gustadores
0.0015%				
5	3.10 x10 ⁶	1.50 x10 ⁸	2.40 x10 ⁸	Ningún sabor desagradable detectado
0.001%				
6	3.90 x10 ⁶	1.10 x10 ⁸	1.20 x10 ⁸	Ningún sabor desagradable detectado
0.0005%				

10 La dosis de 0.015% al no ser óptima desde un punto de vista organoléptico, la dosis de 0.00125% fue probada. Esta dosis representa una solución intermedia muy buena entre la restricción en términos de mantenimiento de población y la restricción en términos de cualidad organoléptica.

15 El perfil sensorial de un producto con 0.00125% (12.5 mg/l) de cisteína agregada fue producido por un jurado de expertos que consiste de 15 individuos entrenados en este tipo de degustación.

Se llevaron a cabo dos repeticiones. Los degustadores tenían que juzgar los productos en base de 23 descriptores. Los resultados basados en estos descriptores (esenciales par definir la calidad organoléptica del producto en relación con el producto de referencia) no mostró ninguna diferencia significativa en base a estos descriptores. Estos descriptores fueron los siguientes:

Apariencia del producto

25 - Suero visual (determinación visual de la cantidad de suero sobre la superficie del producto)

Textura sobre la cuchara antes de la agitación

- Capacidad de retención de forma (es concerniente con la estabilidad de la estructura del producto)

Textura sobre la cuchara después de la agitación del producto

- Espesor (resistencia al movimiento de la cuchara)
- Hilo (continuidad del hilo de flujo)
- 5 - Cobertura (cantidad del producto que cubre la parte posterior de la cuchara)

Textura en la boca después de la agitación del producto

- Se funde (velocidad de desaparición del producto en la boca)
- 10 - Recubrimiento (recubre el interior de la boca)
- Grasa (sensación de grasa en la boca)
- Suave (sensación táctil de suavidad en la boca)

Sabores

- Acido
- 15 - Dulce
- Amargo
- Astringente

Sabores de leche

- Sabores desagradables
- 20 - Crema
- Mantequilla
- Leche
- Queso fresco
- Acetaldehído
- 25 - Lactosuero
- Lactona
- Limón
- Patata

El resultado buscado es una ausencia de diferencia
30 significativa entre el producto de control y el producto

(96

complementado con cisteína.

En el caso presente, un producto de acuerdo con la invención, complementado con 12.5 mg/l de cisteína no exhibe ninguna diferencia significativa en términos de apariencia, 5 textura, sabor y gusto en relación con el producto de control.

REIVINDICACIONES

1. El uso de por lo menos un aminoácido que contiene azufre, a una concentración total de aproximadamente 5 a aproximadamente 75 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, en forma libre, para la implementación de un proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado utilizando fermentos que contienen bifidobacterias, tal producto alimenticio fermentado tiene propiedades organolépticas aceptables, contiene más de aproximadamente 5×10^7 , en particular más de aproximadamente 10^8 bifidobacterias por gramo de producto alimenticio fermentado para un período de conservación de por lo menos 30 días, en particular por lo menos 35 días y no contiene más de 0.5% de extracto de levadura o autolisado de levadura.

2. El uso de por lo menos un aminoácido que contiene azufre, a una concentración total de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l y en particular 12.5 mg/l, en forma libre, para la implementación de un proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado utilizando fermentos que contienen bifidobacterias, tal producto alimenticio fermentado tiene propiedades organolépticas aceptables, contiene más de aproximadamente 5×10^7 , en particular más de aproximadamente 10^8 bifidobacterias por gramo de producto alimenticio fermentado para un período de conservación de por lo menos 30 días, en particular por lo menos 35 días y no contiene más de 0.5% de extracto de levadura o autolisado de levadura.

3. un producto alimenticio fermentado, que tiene propiedades

organolépticas aceptables, caracterizado porque contiene fermentos que comprenden más de aproximadamente 5×10^7 , en particular más de aproximadamente 10^8 bifidobacterias por gramo de producto alimenticio fermentado para un período de conservación de por lo menos 30 días, en particular por lo menos 35 días y que tiene una concentración total de aminoácidos que contienen azufre en forma libre de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l y en particular 12.5 mg/l.

4. El producto alimenticio fermentado de conformidad con la reivindicación 3, caracterizado porque la proporción del número de bifidobacterias contenidas en el producto alimenticio fermentado al final del período de conservación al número de bifidobacterias contenida en el producto alimenticio fermentado al inicio del período de conservación es de al menos 30 días, en particular por lo menos 35 días, es de aproximadamente 0.2 a aproximadamente 0.8, en particular aproximadamente 0.3 a aproximadamente 0.7, en particular aproximadamente 0.4 a aproximadamente 0.5.

5. El producto alimenticio fermentado conservado por un período de conservación de por lo menos 30 días, en particular por lo menos 35 días, a una temperatura de aproximadamente 4 a aproximadamente 10°C , caracterizado porque tiene propiedades organolépticas aceptables y contiene fermentos que comprenden más de aproximadamente 5×10^7 , en particular más de aproximadamente 10^8 bifidobacterias por gramo de producto alimenticio fermentado.

6. El producto alimenticio fermentado de conformidad con

109

cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, caracterizado porque contiene aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, en particular aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l y en particular 12.5 mg/l, de aminoácidos que contienen azufre y aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, en particular aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l y en particular 12.5 mg/l de cisteína y/o aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 15 mg/l de metionina.

7. El producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, caracterizado porque contiene menos de aproximadamente 0.5% (peso/peso) de sustancias que contienen más de aproximadamente 1.7% de aminoácidos libres que contienen azufre.

8. El producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, caracterizado porque contiene menos de aproximadamente 0.5% (peso/peso) de extracto de levadura y/o autolisado de levadura y/o hidrolizado de proteína de leche, planta o soya.

9. El producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, caracterizado porque las bifidobacterias son del tipo *Bifidobacterium animalis*, en particular *Bifidobacterium animalis animalis* y/o *Bifidobacterium animalis lactis* y/o *Bifidobacterium breve* y/o *Bifidobacterium*

longum y/o *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium bifidum*.

10. El producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, caracterizado porque está basado en jugo de plantas y en particular jugo de frutas o
5 jugo de vegetales tales como jugo de soya o en un producto lácteo y en particular leche de vaca y/o leche de cabra.

11. El producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, caracterizado porque los fermentos contienen bacterias lácticas, en particular una o
10 más bacterias del género *Lactobacillus* spp y en particular *Lactobacillus* spp. y en particular *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* y/o *Lactobacillus casei* y/o *Lactobacillus reuteri* y/o *Lactobacillus acidophilus* y/o *Lactobacillus helveticus* y/o *Lactobacillus plantarum* y/o bacterias del tipo *Lactococcus*
15 *cremoris* y/o *Streptococcus thermophilus* y/o *Lactococcus lactis* y/o una o más bacterias del genero *Leuconostoc*.

12. El producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 3 a 11, caracterizado porque la proporción de bifidobacterias en los fermentos es de
20 aproximadamente 20 a aproximadamente 80%, en particular aproximadamente 30 a aproximadamente 70%, en particular aproximadamente 40 a aproximadamente 60% y en particular aproximadamente 50%.

13. El producto alimenticio fermentado de conformidad con
25 cualquiera de las reivindicaciones 3 a 12, caracterizado porque el fermentado en forma de un producto alimenticio fermentado agitado o un producto alimenticio fermentado para beber o un producto alimenticio fermentado para infantes.

14. Un proceso para la preparación de un producto
30 alimenticio fermentado a partir de una sustancia de partida,

caracterizado porque comprende:

- una etapa de siembra de una sustancia de partida, opcionalmente pasteurizada, mediante inoculación con fermentos de siembra que contienen bifidobacterias, con el fin de obtener una
5 sustancia sembrada,

- una etapa de fermentación de la sustancia sembrada obtenida en la etapa precedente con el fin de obtener una sustancia fermentada,

- una etapa de incorporación de por lo menos un aminoácido
10 que contiene azufre en forma libre a una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 75 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, en particular
15 aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l y en particular 12.5 mg/l, esta etapa de incorporación es apta de ocurrir:

- ya sea antes de la etapa de siembra, o

- sustancialmente de manera simultánea con la etapa de
20 siembre, o

- después de la etapa de siembra y antes de la etapa de fermentación,

a condición de que el producto alimenticio fermentado no contenga más de 0.5% (peso/peso) de extracto de levadura y/o autolisado de
25 levadura.

15. El proceso de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque no comprende una etapa de adición de sustancias adicionales que contienen uno o más aminoácidos que contienen azufre.

30 16. El proceso de conformidad con la reivindicación 14,

caracterizado porque comprende una etapa de adición de sustancias adicionales que contienen uno o más aminoácidos que contienen azufre en forma libre, la concentración de los aminoácidos que contienen azufre en forma libre en las sustancias adicionales es
5 menor de aproximadamente 1.7%, preferiblemente menos de aproximadamente 0.5% y la concentración de las sustancias adicionales en el producto alimenticio fermentado es menor de aproximadamente 0.5%.

17. El proceso de conformidad con la reivindicación 14 o 16,
10 caracterizado porque comprende una etapa de adición de sustancias adicionales constituidas por un extracto de levadura y/o autolisado de levadura y/o hidrolizado de proteína de leche, planta o soya a una concentración de menos de aproximadamente 0.5% (peso/peso).

15 18. El proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, caracterizado porque también comprende una etapa de pasteurización que toma lugar antes de la etapa de siembra, haciendo posible obtener una sustancia de partida
20 pasteurizada a partir de la sustancia de partida.

19. Un proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con la reivindicación 18, caracterizado porque la etapa de incorporación de por lo menos un aminoácido que contiene azufre toma lugar antes de la etapa de
25 pasteurización, el aminoácido que contiene azufre o ácido son incorporados a una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 75 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, aproximadamente 12 a aproximadamente 15
30 mg/l y en particular 12.5 mg/l.

20. El proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, caracterizado porque la etapa de incorporación de por lo menos un aminoácido que contiene azufre
5 toma lugar sustancialmente de manera simultánea con la etapa de siembra, el aminoácido que contiene azufre o ácido son incorporados a una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular aproximadamente 5 a
10 aproximadamente 20 mg/l, en particular aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l y en particular 12.5 mg/l.

21. El proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las
15 reivindicaciones 14 a 18, caracterizado porque la etapa de incorporación de por lo menos un aminoácido que contiene azufre toma lugar después de la etapa de siembra y antes de la etapa de fermentación, el aminoácido que contiene azufre o ácidos son incorporados a una concentración de aproximadamente 5 a
20 aproximadamente 50 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, en particular aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l y en particular 12.5 mg/l.

25 22. El proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, caracterizado porque la etapa de adición de una preparación intermediaria simultáneamente con la etapa de siembra o entre la etapa de siembra y la etapa de
30 fermentación, para obtener, a partir de la sustancia sembrada,

114

una sustancia sembrada completa o después de la etapa de fermentación para obtener, a partir de la sustancia fermentada, una sustancia fermentada completa, la preparación intermedia comprende una preparación de frutas y/o cereales y/o aditivos
5 tales como suavizantes y colorantes y la etapa de adición de una preparación intermedia puede tomar lugar simultáneamente con la etapa de incorporación de por lo menos un aminoácido que contiene azufre.

23. El proceso para la preparación de un producto
10 alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 22, caracterizado porque la etapa de siembra comprende inoculación con fermento de siembra que contienen aproximadamente 10^6 a aproximadamente 2×10^8 , más en particular aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7
15 bifidobacterias por ml de sustancia de partida.

24. El proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 23, caracterizado porque las bifidobacterias son escogidas de las bacterias del tipo
20 *Bifidobacterium animalis*, en particular *Bifidobacterium animalis animalis* y/o *Bifidobacterium animalis lactis* y/o *Bifidobacterium breve* y/o *Bifidobacterium longum* y/o *Bifidobacterium infantis* y/o *Bifidobacterium bifidum*.

25. El proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 24, caracterizado porque las bifidobacterias son escogidas de bacterias del tipo
Bifidobacterium animalis.

26. El proceso para la preparación de un producto
30 alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las

reivindicaciones 14 a 25, caracterizado porque los fermentos de siembra contienen bacterias lácticas, en particular una o más bacterias del género *Lactobacillus* spp. y en particular *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* y/o *Lactobacillus casei* y/o

5 *Lactobacillus reuteri* y/o *Lactobacillus acidophilus* y/o *Lactobacillus helveticus* y/o *Lactobacillus plantarum* y/o bacterias del tipo *Lactococcus cremoris* y/o *Streptococcus thermophilus* y/o *Lactococcus lactis* y/o una o más bacterias del género *Leuconostoc*.

10 27. El proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 26, caracterizado porque la proporción de bifidobacterias en los fermentos de siembra es de aproximadamente 20 a aproximadamente 75%, en particular aproximadamente 30 a

15 aproximadamente 50%, en particular aproximadamente 35 a aproximadamente 40% y en particular aproximadamente 37.5%.

28. El proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 27, caracterizado porque la sustancia de

20 partida está basada en jugo de plantas y en particular jugo de frutas o jugo de vegetales tales como jugo de soja o en un producto lácteo y en particular leche de vaca y/o leche de cabra.

29. El proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las

25 reivindicaciones 14 a 28, caracterizado porque la sustancia de partida es una sustancia de partida pasteurizada, que es retenida, opcionalmente homogenizada y enfriada, obtenida de una materia prima, el proceso comprende, antes de la etapa de siembra, las siguientes etapas sucesivas:

30 - una etapa de estandarización de sustancias grasas de la

materia prima para obtener una sustancia estandarizada,

- una etapa de enriquecimiento con materia seca de sustancia estandarizada obtenida en la etapa precedente, para obtener una sustancia enriquecida,

5 - una etapa de precalentamiento de la sustancia enriquecida obtenida en la etapa precedente, para obtener una sustancia de partida,

10 - una etapa de pasteurización y retención de la sustancia de partida obtenida en la etapa precedente, para obtener una sustancia pasteurizada y retenida,

- una etapa opcional de homogenización de la sustancia pasteurizada y retenida obtenida en la etapa precedente para obtener una sustancia pasteurizada, retenida y opcionalmente homogenizada,

15 - una etapa de enfriamiento inicial de la sustancia pasteurizada, retenida y opcionalmente homogenizada obtenida en la etapa precedente, para obtener una sustancia de partida pasteurizada, retenida, opcionalmente homogenizada y enfriada.

20 30. El proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 29, caracterizado porque comprende una etapa de empaque entre la etapa de siembra y la etapa de fermentación, la etapa de empaque hace posible obtener, a partir de la sustancia sembrada obtenida en la etapa de siembra, una
25 sustancia sembrada y empacada.

31. El proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 30, caracterizado porque comprende:

- una etapa de siembra de una sustancia de partida,
30 opcionalmente pasteurizada, mediante inoculación con fermentos de

siembra que contienen aproximadamente 10^6 a aproximadamente 2×10^8 bifidobacterias, más en particular aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^6 bifidobacterias por ml de sustancia, con el fin de obtener una sustancia sembrada,

5 - una etapa de empaque de la sustancia sembrada obtenida en la etapa precedente, con el fin de obtener una sustancia sembrada empacada,

10 - una etapa de fermentación de la sustancia sembrada empacada obtenida en la etapa precedente, de tal manera que la temperatura al inicio de la fermentación es de aproximadamente 36 a aproximadamente 43°C, en particular aproximadamente 37 a aproximadamente 40°C, la temperatura al final de la fermentación es de aproximadamente 37 a aproximadamente 44°C, en particular aproximadamente 38 a aproximadamente 41°C y el tiempo de
15 fermentación es de aproximadamente 6 a aproximadamente 11 horas con el fin de obtener una sustancia fermentada,

20 - una etapa de enfriamiento final de la sustancia fermentada obtenida en la etapa precedente, de tal manera que la temperatura al inicio del enfriamiento final es menor de aproximadamente 22°C y la temperatura al final del enfriamiento final es de aproximadamente 4 a aproximadamente 10°C, para obtener un producto alimenticio fermentado.

32. El proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las
25 reivindicaciones 14 a 29, caracterizado porque comprende las siguientes etapas sucesivas después de la etapa de fermentación:

 - una etapa de enfriamiento intermedio de la sustancia fermentada obtenida en la etapa de fermentación, para obtener una sustancia pre-enfriada,

30 - una etapa de almacenamiento de la sustancia pre-enfriada

obtenida en la etapa precedente, para obtener una sustancia almacenada,

- una etapa de enfriamiento final de la sustancia almacenada obtenida en la etapa precedente, para obtener un producto alimenticio fermentado.

33. El proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 29 o 32, caracterizado porque la etapa de fermentación es de tal manera que la temperatura al inicio de la fermentación es de aproximadamente 36 a aproximadamente 43°C y en particular aproximadamente 37 a aproximadamente 40°C, la temperatura al final de la fermentación es de aproximadamente 37 a aproximadamente 44°C y en particular aproximadamente 38 a aproximadamente 41°C y el tiempo de fermentación es de aproximadamente 6 a aproximadamente 11 horas.

34. El proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 32 o 33, caracterizado porque la etapa de enfriamiento intermedia es de tal manera que el tiempo de enfriamiento intermedio es de aproximadamente una hora a aproximadamente 4 horas y en particular aproximadamente una hora 30 minutos a aproximadamente 2 horas y la temperatura de enfriamiento intermedia es de aproximadamente 4 a aproximadamente 22°C.

35. El proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 32 a 34, caracterizado porque la etapa de almacenamiento es de tal manera que el tiempo de almacenamiento es menor o igual a aproximadamente 40 horas.

36. El proceso para la preparación de un producto

alimento fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 32 a 35, caracterizado porque la etapa de enfriamiento final es de tal manera que la temperatura al inicio del enfriamiento final es menor de aproximadamente 22°C y la temperatura al final del enfriamiento final es de aproximadamente 4 a aproximadamente 10°C.

37. El proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 29 o 32 a 35, caracterizado porque comprende:

- una etapa de siembra de una sustancia de partida, opcionalmente pasteurizada, mediante inoculación con fragmentos de siembra que contienen aproximadamente 10^6 a aproximadamente 2×10^8 , más en particular aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^7 bifidobacterias por ml de sustancia de partida con el fin de obtener una sustancia sembrada,

- una etapa de fermentación de sustancia sembrada obtenida en la etapa precedente, de tal manera que la temperatura al inicio de la fermentación es de aproximadamente 36 a aproximadamente 43°C, en particular aproximadamente 37 a aproximadamente 40°C, la temperatura al final de la fermentación es de aproximadamente 37 a aproximadamente 44°C, en particular aproximadamente 38 a aproximadamente 41°C y el tiempo de fermentación es de aproximadamente 6 a aproximadamente 11 horas, con el fin de obtener una sustancia fermentada,

- una etapa de enfriamiento intermedio de la sustancia fermentada obtenida en la etapa precedente, de tal manera que el tipo de enfriamiento intermedio es de aproximadamente una hora a aproximadamente 4 horas, en particular aproximadamente una hora 30 minutos a aproximadamente 2 horas y la temperatura de

enfriamiento intermedia es de aproximadamente 4 a aproximadamente 2°C, para obtener una sustancia pre-enfriada,

- una etapa de almacenamiento de la sustancia pre-enfriada obtenida en la etapa precedente, de tal manera que el tiempo de
5 almacenamiento es menor o igual a aproximadamente 40 horas, para obtener una sustancia almacenada,

- una etapa de enfriamiento final de la sustancia almacenada obtenida en la etapa precedente, de tal manera que la temperatura al inicio del enfriamiento final es menor de aproximadamente 22°C
10 y la temperatura al final del enfriamiento final es de aproximadamente 4 a aproximadamente 10°C para obtener un producto alimenticio fermentado.

38. El proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las
15 reivindicaciones 32 a 37, caracterizado porque comprende una etapa de agitación adicional entre la etapa de fermentación y la etapa de enfriamiento intermedia, haciendo posible obtener, a partir de la sustancia fermentada obtenida en la etapa de fermentación, una sustancia fermentada agitada.

20 39. El proceso para la preparación de un producto alimenticio fermentado de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 32 a 38, caracterizado porque comprende después de la etapa de enfriamiento final, una etapa de conservación del producto alimenticio fermentado a una temperatura comprendida
25 entre aproximadamente 4 y aproximadamente 10°C.

40. Un producto alimenticio fermentado caracterizado porque es obtenido a partir del proceso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 39.

RESUMEN DE LA INVENCION

La invención es concerniente principalmente con el uso de por lo menos un aminoácido que contiene azufre, a una concentración total de aproximadamente 5 a 75 mg/l, en particular de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/l, en particular de aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, en forma libre, para implementar un método para la preparación de un producto alimenticio fermentado por medio de fermentos que contienen bifidobacterias, el producto alimenticio tiene propiedades sensoriales aceptables, contiene más de aproximadamente 5×10^7 , en particular más de aproximadamente 10^8 bifidobacterias por gramo de producto alimenticio fermentado para un tiempo de vida de almacenamiento de por lo menos 30 días, en particular un tiempo de vida de almacenamiento de por lo menos 35 y que contiene no más de 0.5% de extracto de levadura o de autolisado de levadura.

20

25

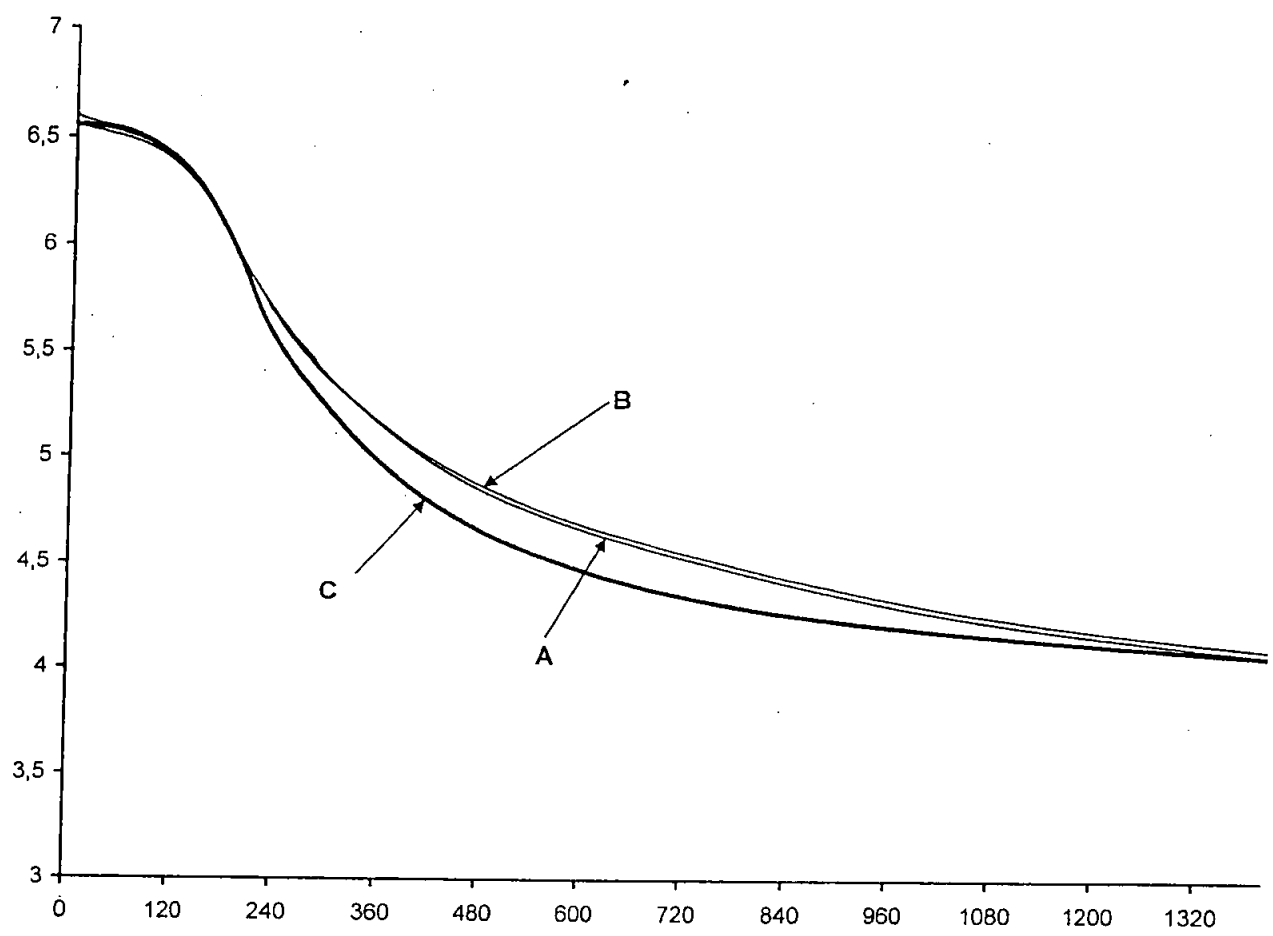


Fig 1

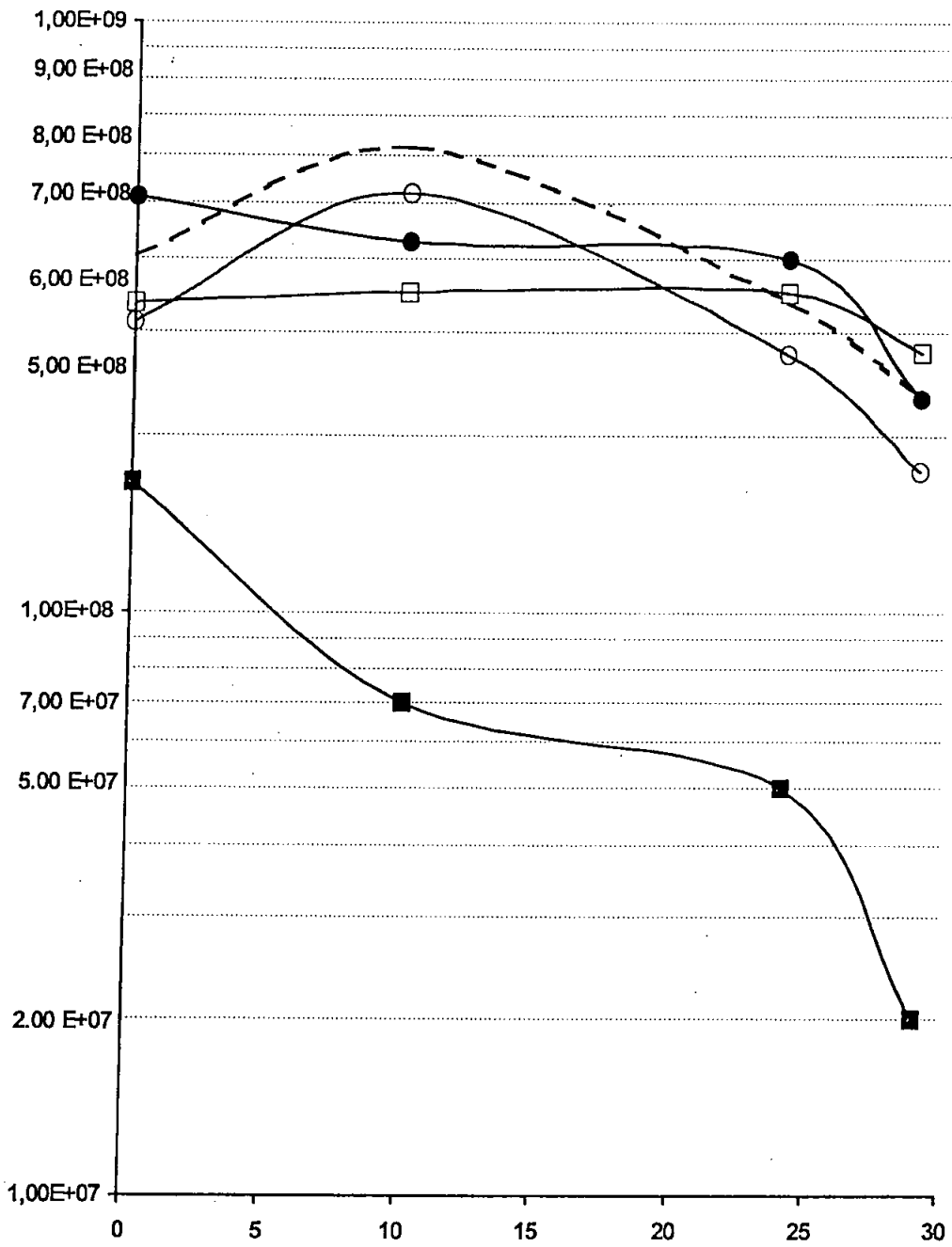


Fig. 3

125

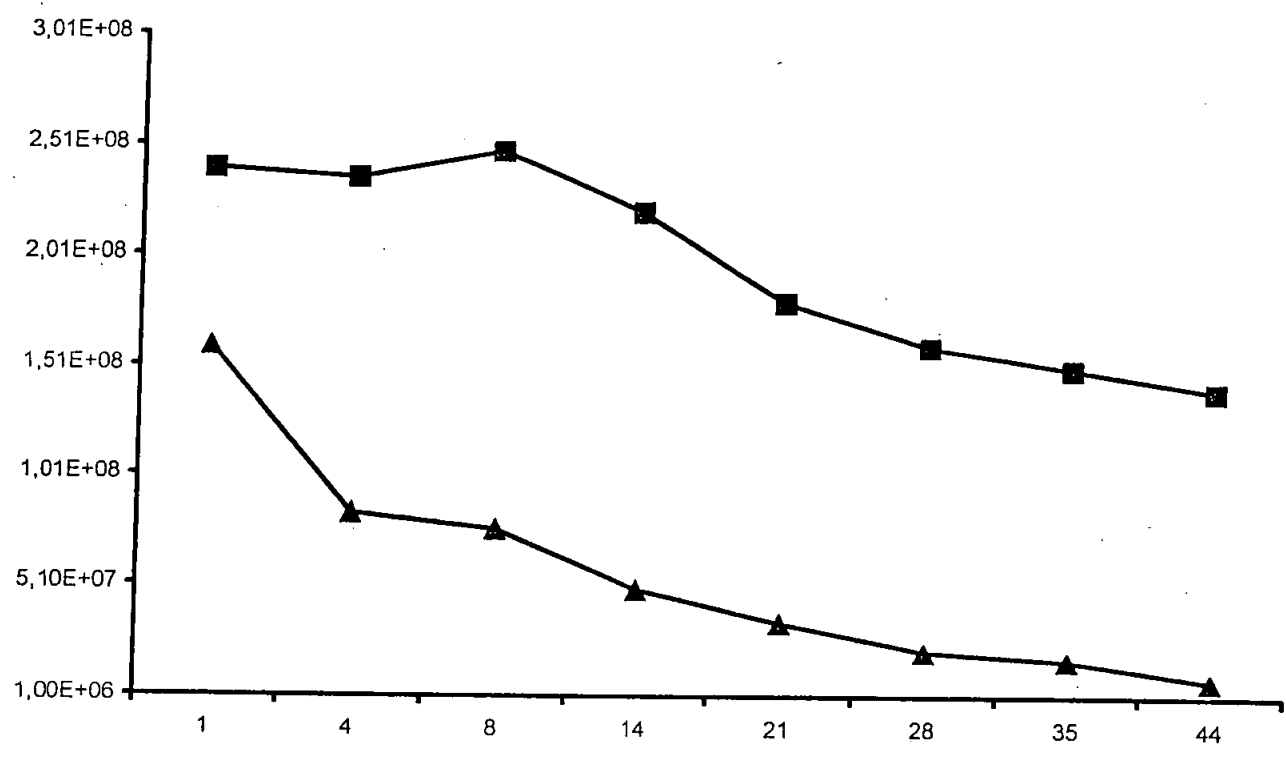


Fig 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2006/001688

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A23C9/123 A23C9/12 A23L1/238 A23L1/211 A23B7/10 A23C11/10		
According to international Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A23C A23L A23B		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS, FSTA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DAVE R I ET AL: "INGREDIENT SUPPLEMENTATION EFFECTS ON VIABILITY OF PROBIOTIC BACTERIA IN YOGHURT" JOURNAL OF DAIRY SCIENCE, AMERICAN DAIRY SCIENCE ASSOCIATION, SAVOY, IL, US, vol. 81, no. 11, November 1998 (1998-11), pages 2804-2816, XP000787922 ISSN: 0022-0302 page 2805, right-hand column, paragraph 2 tables 4,5 ----- -/--	1-40
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 November 2006		Date of mailing of the international search report 06/02/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Smeets, Dieter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2006/001688

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DECHTER T H ET AL: "SURVIVABILITY AND BETA-GALACTOSIDASE ACTIVITY OF BIFIDOBACTERIA STORED AT LOW TEMPERATURES" FOOD BIOTECHNOLOGY, DEKKER, NEW YORK, NY, US, vol. 12, no. 1/2, 1998, pages 73-89, XP008039285 ISSN: 0890-5436 page 76, paragraph 3 page 82, paragraph 3 pages 84-88; figures 1,2	5,7-13
X	EP 0 281 467 A (THE CALPIS FOOD INDUSTRY CO., LTD) 7 September 1988 (1988-09-07) examples; table 1	5,7-13
X	FR 2 842 707 A (ATELIER DE FROMAGE CO LTD) 30 January 2004 (2004-01-30) table 1	5,7-13
X	RU 2 169 763 C1 ('NO-PROIZVODSTVENNOE PREDPRIJATIE "VEKTOR-BIAL'GAM) 27 June 2001 (2001-06-27) abstract	5,6
A		1-4,7-40

128

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/FR2006/001688

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0281467	A	07-09-1988	DE 3870283 D1	27-05-1992
			GB 2215178 A	20-09-1989
			JP 1957510 C	10-08-1995
			JP 6087732 B	09-11-1994
			JP 63209542 A	31-08-1988
			US 4913913 A	03-04-1990
FR 2842707	A	30-01-2004	CN 1483332 A	24-03-2004
			JP 3364491 B2	08-01-2003
			JP 2002335860 A	26-11-2002
RU 2169763	C1	27-06-2001	NONE	

3. un producto alimenticio fermentado, que tiene propiedades organolépticas aceptables, caracterizado porque contiene fermentos que comprenden más de aproximadamente 5×10^7 , en particular más de aproximadamente 10^8 bifidobacterias por gramo de producto alimenticio fermentado para un periodo de conservación de por lo menos 30 días, en particular por lo menos 35 días y que tiene una concentración total de aminoácidos que contienen azufre en forma libre de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 30 mg/l, en particular aproximadamente 5 a aproximadamente 20 mg/l, aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg/l, en particular aproximadamente 12 a aproximadamente 15 mg/l y en particular 12.5 mg/l.

130

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 1,665
FECHA : ENERO 8 DE 2008



***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	2808481	08/01/2008	56,858,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	501,000.00
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Cdo 06068-841002-0

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-002395- -00000-0000

Fecha: 2008-01-11 16:56:09 Dep. 2020 NUECREACION:
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 130



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD

☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Claudia M. Nuvo Cortes
Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

132

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
COMPAGNIE GERVAIS DANONE

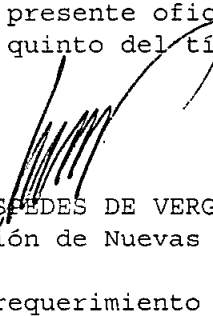
REFERENCIA	Radicación No.	8 2395
	Solicitud internacional	PCT/FR2006/001688
	Fecha inicio fase nacional	13/02/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	3113

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 29 FEB. 2008
jfernand