

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>1999.10.08</b>	(73) Titular(es): <b>OATLY AB</b> <b>FÖRETAGSVÄGEN 42 261 51 LANDSKRONA SE</b>
(30) Prioridade(s): <b>1998.10.19 US 104706 P</b> <b>1998.10.30 US 106224 P</b> <b>1999.04.29 US 302127</b>	(72) Inventor(es): <b>ANGELIKA OSTE TRIANTAFYLLOU</b> <b>SE</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2001.08.16</b>	(74) Mandatário: <b>PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA</b> <b>RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA</b> <b>PT</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2011.01.26</b> <b>034/2011</b>	

(54) Epígrafe: **SUSPENSÕES DE CEREAIS MODIFICADAS POR ENZIMAS**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO PROPORCIONA MÉTODOS EFICIENTES, SELECTIVOS E ECONÓMICOS PARA PRODUZIR SUSPENSÕES DE CEREAIS POSSUINDO O AROMA E/OU SABOR DE CEREAIS NATURAIS E PARA MODIFICAR A VISCOSIDADE E/OU TIPO DE AÇÚCAR DE SUSPENSÕES DE CEREAIS. OS MÉTODOS INCLUEM O TRATAMENTO DE UMA SUSPENSÃO DE SUBSTRATO DE CEREAL COM UMA PREPARAÇÃO ENZIMÁTICA QUE COMPREENDE, PELO MENOS, UMA HIDROLASE POSSUINDO A CAPACIDADE DE HIDROLISAR LIGAÇÕES &#914;-GLICOSÍDICAS E NÃO POSSUINDO EFEITO DE GLUCANASE E PROTEINASE. A HIDROLASE PODE SER SELECIONADA DO GRUPO CONSISTINDO EM &#914;-AMILASE, &#913;-AMILASE, AMIOGLUCOSIDASE E PULULANASE, COM A CONDIÇÃO DE QUE QUANDO A PREPARAÇÃO ENZIMÁTICA COMPREENDE &#914;-AMILASE OU &#913;-AMILASE EXISTE SEMPRE UMA MISTURA DE, PELO MENOS, UMA OUTRA DAS HIDROLASES &#914;-GLICOSÍDICAS. ADICIONALMENTE ÀS HIDROLASES ACIMA IDENTIFICADAS, AS PREPARAÇÕES ENZIMÁTICAS DA PRESENTE INVENÇÃO PODEM AINDA COMPREENDER UMA ISOMERASE, TAL COMO GLUCOSE ISOMERASE.

## **DESCRIÇÃO**

### **"SUSPENSÕES DE CEREAIS MODIFICADAS POR ENZIMAS"**

#### **CAMPO TÉCNICO**

A presente invenção refere-se a suspensões de enzimas compreendendo preparações enzimáticas para hidrólise enzimática de amido de cereais. Num outro aspecto, refere-se a métodos de produzir suspensões de cereais homogéneas e estáveis preparadas utilizando as preparações enzimáticas.

#### **TÉCNICA ANTERIOR**

Os efeitos benéficos na saúde das fibras dietéticas são bem conhecidos. Neste contexto existe um interesse crescente nos produtos alimentares feitos com grãos, tais como aveia e cevada.

Em muitos aspectos, as aveias são diferentes de outros grãos. Estes têm um teor elevado em proteína e gordura comparável aos cereais, assim como um elevado conteúdo em  $\beta$ -glucano.

Nos últimos anos, tem existido um interesse crescente em produtos alimentares preparados com aveias. A razão principal para isto é que se verificou que as fibras de aveia tinham um efeito saudável diminuindo o nível de colesterol no soro de indivíduos hipercolesterémicos. Outra razão é o facto de as

aveias conterem proteína de elevado valor alimentar assim como uma considerável proporção de ácidos mono e polinsaturados. Além disso, as aveias contêm muitos aminoácidos essenciais e minerais.

Uma grande vantagem das aveias é que todo o grão pode ser utilizado para preparar vários produtos uma vez removida a casca. Em aveias, as substâncias mais nutritivas estão distribuídas de forma uniforme em todo o grão. Em outros grãos, as substâncias nutritivas estão frequentemente concentradas em partes específicas do grão.

Os aspectos nutricionais dos componentes de aveia promoveram a introdução de aveias ou partes destas em vários produtos alimentares diferentes. Por exemplo, o Pedido de Patente Europeia N° 0577294 (de R. Jenkins) divulga um processo para a preparação de substâncias de substituição de gordura e géis termo-irreversíveis. O processo envolve a hidrólise de um cereal, tal como as aveias, com uma enzima, tal como  $\alpha$ -amilase, amiloglucosidase, celulase, pululanase, glucosiltransferase de ciclodextrina ou protease, ou suas combinações. Após inactivação das enzimas, a fracção solúvel (fibras dietéticas e maltodextrinas) é separada da fracção insolúvel.

O Pedido de Patente Europeia N° 0231729 (de R. Bergskvist e K. Claesson) divulga um processo para a preparação de produtos alimentares utilizando substituintes de adoçantes produzidos por degradação enzimática dos grãos completos de cereais até, pelo menos, ao nível dos oligossacáridos. O processo inclui um tratamento de dois passos com enzimas, em que um tratamento inicial com  $\alpha$ -amilase é seguido por um tratamento com uma  $\beta$ -amilase. O tratamento subsequente com  $\beta$ -amilase pode ocorrer

em combinação com uma enzima do tipo pululanase. Para reduzir uma suspensão de viscosidade elevada, é recomendado um pré-tratamento utilizando antes  $\beta$ -glucanase ou em simultâneo com um tratamento com  $\alpha$ -amilase.

A Patente U.S. N° 4996063 (G. F. Inglett) divulga a preparação de composições de fibras dietéticas solúveis em água através do tratamento de produtos de aveia moídos com  $\alpha$ -amilases. A  $\alpha$ -amilase serve para diminuir a espessura do amido de aveia e qualquer  $\alpha$ -amilase pode, deste modo, ser utilizada. As composições de fibra dietética pulverulentas produzidas são utilizadas como aditivos em produtos alimentares, tal como substitutos de gordura.

Além disso, o processo de hidrolisar enzimaticamente o componente amido de cereais é divulgado na Patente U.S. N° 5686123 (de L. Lindahl *et al.*) que preconiza um método para a produção de uma suspensão de cereal homogénea e estável possuindo o paladar e o aroma de aveias naturais; o pedido de Patente PCT N° WO 95/27407 (de C. Fitchett e P. Latham) refere-se a um processo para a preparação de um substituinte de gordura rico em dextrinas utilizando um passo único, um tratamento com enzima; o pedido de Patente Europeia N° 0097973 (de R. Horwarth e R. Irbe) divulga um método para produzir frutose a partir de glucose utilizando amido de, principalmente, trigo ou milho; e a Patente Britânica N° 1495220 (de H. Muller) divulga um método multi-passo de produção de dextrose e dextrinas a partir de amidos contendo proteína e a separação destes produtos das proteínas e outros produtos colaterais.

Existe a necessidade de preparações enzimáticas que hidrolisem o amido de cereais de uma forma menos dispendiosa e

morosa, produzindo ao mesmo tempo um produto de suspensão de cereal que retenha as qualidades de paladar e aromáticas do cereal natural e em que a viscosidade,  $\beta$ -glucano, teor em açúcar, e textura geral podem ser regulados ou modificados para um produto preferido.

#### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Para os objectivos desta invenção, os termos e expressões que aparecem a seguir na descrição e reivindicações pretendem ter os significados seguintes:

**"Suspensão de cereal pré-processado"** como aqui utilizado significa um produto que foi previamente processado pelo método revelado na Patente U.S. N° 5686123.

**"Substrato de cereal"** como aqui utilizado significa uma suspensão seleccionada do grupo consistindo em refeição de suspensão de cereal, suspensão de cereal pré-processado e suas misturas.

**"Suspensão de farinha de aveia"** como aqui utilizado significa uma suspensão compreendendo farinha de aveia e/ou flocos de aveia.

Consequentemente, é um objectivo principal da presente invenção proporcionar uma suspensão de enzima modificada compreendendo uma suspensão de substrato de cereal e uma preparação enzimática para hidrólise enzimática de constituintes na suspensão de substrato de cereal em que as propriedades específicas da suspensão de substrato de cereal, tais como

viscosidade e/ou conteúdo em proporção de açúcar modificado, são modificadas através de tratamento com combinações de várias hidrolases e isomerases.

É outro objectivo da presente invenção proporcionar um método eficiente, selectivo e económico para produzir uma suspensão de cereais possuindo o aroma e/ou paladar dos cereais naturais e possuindo a melhoria inesperada de regulação da viscosidade e/ou teor em açúcar da suspensão de cereais através do tratamento com uma gama de novas preparações enzimáticas.

É um objectivo adicional da presente invenção proporcionar uma suspensão de cereais homogénea e estável possuindo o aroma e/ou sabor dos cereais naturais e contendo  $\beta$ -glucanos intactos que são componentes de uma suspensão de substrato de cereal.

Ainda outro objectivo da presente invenção é proporcionar um método para preparar a suspensão de cereais homogénea e estável possuindo o aroma e gosto dos cereais naturais e contendo  $\beta$ -glucanos intactos.

Todos os objectivos acima podem ser conseguidos por uma suspensão de enzima modificada compreendendo uma suspensão de substrato de cereal e uma preparação enzimática para hidrólise enzimática de constituintes na suspensão de substrato de cereal. A preparação enzimática compreende, pelo menos, duas hidrolases com a capacidade de hidrolisar ligações  $\alpha$ -glicosídicas dos constituintes de uma suspensão de substrato de cereal e, opcionalmente, combinando, pelo menos, uma hidrolase com uma isomerase. Os constituintes podem incluir amilose, amilopectina, maltodextrinas, maltose, maltotriose e uma sua mistura. Mais especificamente, os objectivos acima podem ser conseguidos por

uma suspensão de enzima modificada compreendendo uma suspensão de substrato de cereal e uma preparação enzimática, em que a preparação enzimática compreende as hidrolases possuindo a capacidade de hidrolisar ligações  $\alpha$ -glicosídicas de constituintes de uma suspensão de substrato de cereal. É preferido que a preparação enzimática não possua actividade de glucanase e/ou proteinase. As hidrolases utilizadas consistem em  $\beta$ -amilase e  $\alpha$ -amilase. Ambas, a  $\beta$ -amilase e  $\alpha$ -amilase são combinadas em simultâneo na suspensão de substrato de cereal. Adicionalmente às hidrolases acima identificadas, as preparações enzimáticas da presente invenção podem ainda compreender uma isomerase, por exemplo, glucose isomerase.

As preparações enzimáticas previamente discutidas podem ser utilizadas para produzir uma suspensão de cereais homogénea e estável melhorada possuindo o aroma e sabor de cereais naturais e contendo  $\beta$ -glucanos intactos, a suspensão de cereais melhorada preparada pelo método compreendendo os passos de:

a) Proporcionar uma suspensão de substrato de cereal;

b) tratar a suspensão de substrato de cereal do passo (a) com uma preparação enzimática como previamente discutido, nomeadamente uma preparação enzimática para hidrólise enzimática de um amido de cereal na suspensão compreendendo, pelo menos, duas enzimas hidrolases possuindo a capacidade de hidrolisar ligações  $\alpha$ -glicosídicas. A hidrolase  $\alpha$ -glicosídica é seleccionada do grupo consistindo em  $\beta$ -amilase e  $\alpha$ -amilase com a condição de que a preparação enzimática compreende uma sua mistura. As enzimas são introduzidas simultaneamente na suspensão de substrato de cereal.

Consequentemente, o principal objectivo desta invenção é proporcionar uma suspensão de cereal de aveia modificada por enzima e o método para a sua preparação. A suspensão de cereais de aveia terá o aroma e/ou paladar de cereais naturais e conterá unidades de maltose e maltodextrina,  $\beta$ -glucanos intactos e proteínas. O método para produzir a suspensão de cereais de aveia modificada inclui a hidrólise da suspensão de cereais de aveia com uma composição de enzima consistindo em  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase. Esta composição é isenta de actividade de glucanase e protease. Além disso, a introdução simultânea de  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase proporciona um meio para pré-determinar as viscosidades da suspensão. Se um processo particular necessita de uma viscosidade no intervalo de 45 mPas a 65 mPas, pode ser preparada uma composição de enzima de quantidades variáveis de  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase para produzir: (1) esse intervalo de viscosidade, (2) num determinado período de tempo, e (3) a uma dada taxa de fragmentação de, neste caso,  $700\text{ s}^{-1}$ . Além disso, a introdução simultânea de  $\alpha$ -amilase e  $\beta$ -amilase proporciona a hidrólise enzimática acelerada, a regulação do teor de açúcar da suspensão de cereais de aveia modificada e a utilização de menores quantidades das enzimas do que quando as enzimas seriam utilizadas separadamente.

O método de preparação da suspensão de cereais homogénea e estável melhorada pode também incluir a realização de, pelo menos, um passo no processo de finalização para melhorar o tempo de vida do cereal, tal como: remover partículas grosseiras por centrifugação ou decantação; homogeneizar a suspensão tratada com enzima; e/ou submetendo o produto a tratamentos de Temperatura Ultra Elevada (UHT) divulgados, em *Food Engineering and Dairy Technology*, H. G. Kessler, Verlay A. Kessler, 1981, capítulo 6, pp. 139-207 cujo conteúdo é aqui incorporado por



referência. Após UHT, o produto pode ser assepticamente embalado. Processos adicionais para uma estabilidade em armazenamento melhorada podem incluir pasteurização e refrigeração; ou evaporação e subsequentemente secagem por aspersão para produzir um pó estável. De um modo preferido, a suspensão tratada com enzima é homogeneizada e submetida a UHT e assepticamente embalada.

A actividade enzimática pode ser terminada ou removida da suspensão tratada com enzima antes do processamento para melhorar a estabilidade em armazenamento. Como uma alternativa, a actividade da enzima pode ser terminada durante alguns dos processos que melhoram a estabilidade em armazenamento do produto, tal como o processo UHT.

Opcionalmente, a suspensão tratada com enzima do passo (b) pode ser tratada sequencialmente com uma segunda preparação enzimática compreendendo duas enzimas hidrolase possuindo a capacidade de hidrolisar ligações  $\alpha$ -glicosídicas consistindo em  $\beta$ -amilase, e  $\alpha$ -amilase. Ainda a este respeito, as suspensões de substratos de cereal melhorado acima podem ser tratadas combinando uma isomerase, tal como glucose isomerase com as hidrolases das preparações enzimáticas.

A suspensão de cereais homogénea e estável melhorada possuindo o aroma e o sabor de cereais naturais e contendo  $\beta$ -glucanos intactos pode também ser preparada pelo método compreendendo os passos de:

- a) preparar uma suspensão de farinha de cereal;
- b) tratar a suspensão de farinha de cereal do passo (a) com  $\beta$ -amilase e  $\alpha$ -amilase;

c) tratar a suspensão tratada com enzima do passo (b) com uma preparação enzimática como aqui discutido previamente acima compreendendo, pelo menos, uma enzima hidrolase possuindo a capacidade de hidrolisar ligações  $\alpha$ -glicosídicas. De um modo preferido, uma hidrolase  $\alpha$ -glicosídica é seleccionada do grupo consistindo em  $\beta$ -amilase e  $\alpha$ -amilase.

É preferido que quando a preparação enzimática compreende ambas a  $\beta$ -amilase e  $\alpha$ -amilase, as enzimas são introduzidas simultaneamente com as suspensões de substrato de cereal.

A suspensão tratada com enzima do passo (b) e (c) pode ser ainda tratada através da actividade enzimática descontínua e/ou realização posterior de um passo de processo de finalização.

#### **DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO PREFERIDAS**

De acordo com a invenção, é proporcionada uma preparação enzimática para hidrólise enzimática de constituintes numa suspensão de substrato de cereal, compreendendo, pelo menos, duas enzimas hidrolase possuindo a capacidade de hidrolisar ligações  $\alpha$ -glicosídicas. As hidrolases podem consistir em  $\beta$ -amilase e  $\alpha$ -amilase. De um modo preferido, quando a preparação enzimática compreende  $\beta$ -amilase e  $\alpha$ -amilase existe uma mistura de, pelo menos, duas ou mais das denominadas hidrolases  $\alpha$ -glicosídicas e, de um modo mais preferido, quando combinadas na preparação enzimática, as enzimas são introduzidas simultaneamente com a suspensão de substrato de cereal. Além, das hidrolases acima identificadas, a preparação enzimática pode ainda compreender uma isomerase, tal como glucose isomerase.

Em formas de realização preferidas da invenção, as preparações enzimáticas podem compreender uma mistura de  $\alpha$ -amilase  $\beta$ -amilase e amiloglucosidase. As preparações enzimáticas acima compreendendo uma hidrolase com outra podem compreender ainda uma isomerase, tal como glucose isomerase.

As preparações enzimáticas da presente invenção convertem amido de cereal, que compreende ambos amilose e amilopectina, com maltodextrinas de elevado peso molecular e compostos de baixo peso molecular de vários graus de modificação, tais como maltotriose, maltose e glucose. Por exemplo, a  $\beta$ -amilase hidrolisa ligações  $\alpha$ -1-4 glicosídicas sequencialmente a partir da extremidade terminal de não-redução de amilose e amilopectina com um produto de maltose clivado; a  $\alpha$ -amilase hidrolisa ligações  $\alpha$ -1-4 glicosídicas internas em ambas amilose e amilopectina com uma maltodextrina clivada; e a amiloglucosidase hidrolisa ligações  $\alpha$ -1-4 e 1-6 glicosídicas na extremidade de não-redução das moléculas de glucose de libertação de amido. Por isso, uma combinação de hidrolases possuindo a capacidade de hidrolisar ligações  $\alpha$ -glicosídicas irá proporcionar várias proporções de maltodextrina/açúcar numa suspensão de cereais tratada com enzima.

A escolha das enzimas e o tempo de reacção determinam o grau de degradação e o espectro do produto. São produzidas diferentes espécies de di- e monossacáridos utilizando diferentes preparações enzimáticas que incluem a combinação de, pelo menos, uma hidrolase  $\alpha$ -glicosídica e/ou uma isomerase. Os produtos finais podem incluir o dissacárido, maltose e os monossacáridos, frutose e glucose. Quando se combina  $\beta$ -amilase e  $\alpha$ -amilase, a  $\alpha$ -amilase promove a acção da  $\beta$ -amilase obtendo, desse modo, unidades de maltose e maltodextrina enquanto se

utiliza uma quantidade menor de enzimas se as enzimas forem então utilizadas separadamente. Um amido de cereal pode ser convertido inteiramente em compostos de baixo peso molecular, tal como glucose através da combinação de, por exemplo,  $\beta$ -amilase,  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase. A glucose isomerase, unicamente, irá resultar na produção de frutose quando adicionada a um substrato de cereal que já contém glucose. Na alternativa, a preparação enzimática quando a  $\beta$ -amilase,  $\alpha$ -amilase e amiloglucosidase são combinadas com glucose isomerase pode também produzir um produto com níveis de frutose elevados.

As preparações enzimáticas, que sendo uma mistura de enzimas podem tratar uma suspensão de substrato de cereal da presente invenção introduzindo enzimas livres directamente numa suspensão de substrato de cereal ou na alternativa, introduzindo a suspensão de substrato de cereal num recipiente contendo enzimas imobilizadas.

Enzimas livres, como aqui utilizado, significa enzimas que são livres para se moverem na suspensão e não estão restringidas por confinamento ou fixas a um substrato. Normalmente, as enzimas ou células livres não são reutilizadas porque são demasiado pequenas para filtrar e a recuperação pode implicar custos proibitivos. Por isso, a eliminação da actividade biocatalítica das enzimas livres na presente invenção é normalmente realizada através da desnaturação da enzima.

As enzimas imobilizadas como aqui utilizadas significam enzimas livres que estão fisicamente confinadas através de métodos diferentes incluindo, mas não limitadas a, membranas semi-permeáveis, fibras ocas ou membranas de ultrafiltração. As

enzimas imobilizadas, sejam solúveis ou insolúveis, permitem a imobilização simultânea de muitas enzimas, controlando selectivamente os substratos e produtos através de selectividade de membrana. Como utilizadas na presente invenção, as enzimas imobilizadas proporcionam facilidade de aplicação e tratamento do caldo de suspensão de cereal num reactor de modo contínuo.

Os benefícios das enzimas imobilizadas incluem a recuperação completa das enzimas a partir da mistura reaccional utilizadas num modo de operação descontínuo ou contínuo. Assim, as enzimas podem ser utilizadas repetidamente sem qualquer contaminação do produto final e sem a necessidade de aquecer o produto de modo a desnaturar a enzima. Também, podem ser utilizadas concentrações maiores de enzima imobilizada porque as enzimas imobilizadas podem ser recuperadas e reutilizadas, resultando numa diminuição do tempo de reacção e/ou do tamanho do recipiente necessário para realizar a reacção. Outra vantagem é a ausência virtual da enzima no produto final de modo a que a enzima apenas tenha que ser aprovada como um auxiliar de processamento alimentar e não como um aditivo alimentar, mesmo quando o aquecimento e a subsequente inactivação da enzima não estão incluídos no processo.

Está ainda contemplado pela requerente que as enzimas utilizadas para preparar as suspensões de enzima modificada e/ou a suspensão de cereais melhorada homogénea e estável podem incluir enzimas derivadas de células totais, organelos ou mesmo microrganismos utilizados como catalisadores biológicos num processo de fermentação.

Na presente invenção, as condições globais incluindo temperatura, pH e a adição de outros substratos, tais como

cofactores enzimáticos ou agentes tamponantes irão determinar a actividade enzimática, e por isso, o rendimento e a qualidade do produto final. É conhecido que as enzimas podem ser extraídas de diferentes fontes, mas podem catalisar a mesma reacção. Por exemplo, a  $\alpha$ -amilase do organismo fúngico *Aspergillus oryzae* possui um pH óptimo de 4,7 e uma temperatura óptima de 50 °C, enquanto que a  $\alpha$ -amilase da bactéria *Bacillus licheniformis* possui um pH óptimo de 7,5 e uma temperatura óptima de 90 °C. Assim entendido, as condições óptimas, incluindo a quantidade de enzima, a temperatura da pasta, o tempo de agitação e o valor de pH são otimizados para obter um produto final de viscosidade adequada. As técnicas utilizadas para determinar os parâmetros óptimos são bem conhecidas e largamente utilizadas na técnica.

As preparações enzimáticas da presente invenção podem ser utilizadas para proporcionar uma suspensão de cereais melhorada homogénea e estável possuindo o aroma e o sabor de cereais naturais e contendo  $\beta$ -glucanos intactos. As preparações enzimáticas são utilizadas para tratar um substrato de cereal que pode incluir uma suspensão de farinha de cereal, uma suspensão de cereal pré-processado ou uma sua mistura.

Numa forma de realização, a suspensão de substrato de cereal é uma suspensão de farinha de cereal. A suspensão de farinha de cereal é preparada por moagem dos flocos de cereais secos ou húmidos, ou caso contrário, tratando os cereais para a refeição com aquecimento e água e suspendendo a farinha de cereal em água para formar uma suspensão de farinha de cereal. Opcionalmente, a suspensão pode ser centrifugada ou decantada de modo a remover partículas de fibra grosseiras, antes de ser tratada com a preparação enzimática.

Convenientemente, a suspensão de farinha de cereal é preparada com base em flocos de aveia pré-gelatinizados produzidos comercialmente retendo o sabor e o aroma originais das aveias. Os flocos de aveia são moídos para farinha de aveia através de moagem total, seca ou húmida. Na moagem seca, a farinha de aveia é suspensa em água, de um modo preferido, a uma temperatura de 50°-65 °C. Também na moagem húmida, é utilizada água, de um modo preferido, a uma temperatura de 50°-65 °C. São obtidos resultados especialmente bons se a água tiver sido desionizada.

Para uma maioria do amido contido na farinha do cereal, o aquecimento da suspensão para uma temperatura entre 50° e 65 °C gelatiniza o cereal amido para uma hidrolisação mais fácil. Contudo, algumas aveias contêm amidos resistentes que não são gelatinizados a estas temperaturas, e por isso, não são facilmente hidrolisados pelas preparações enzimáticas da presente invenção. Neste momento, verificou-se ser benéfico iniciar a hidrólise do amido não resistente num primeiro passo de tratamento com enzima com as preparações enzimáticas da presente invenção e depois submetendo a suspensão a temperaturas mais elevadas, de um modo preferido, acima dos 100 °C para gelatinizar o amido resistente. A suspensão é subsequentemente arrefecida até uma temperatura de trabalho e condições convencionais. A suspensão é a retratada com as preparações enzimáticas da presente invenção. Consequentemente, o amido não resistente na suspensão de farinha de cereal pode ser hidrolisado com as preparações enzimáticas da presente invenção e depois a suspensão é tratada por aquecimento até uma temperatura mais elevada para solubilizar o amido resistente. A suspensão é arrefecida até uma temperatura que é adequada para actividade enzimática e depois retratada com uma preparação

enzimática da presente invenção. Este método irá permitir uma hidrolisação mais completa de substancialmente todo o amido do cereal, incluindo o amido resistente na suspensão de farinha de cereal.

Adequadamente, a pasta ou suspensão possui uma proporção em peso de farinha para água no intervalo de cerca de 1:6 a cerca de 1:9, que corresponde a um teor de sólidos secos de cerca de 10 a cerca de 15% p/v. A suspensão é agitada até a farinha ter sido dispersa. A pasta deve possuir um pH de, pelo menos, 5 a cerca de 8. Este intervalo de pH demonstrou ser eficaz quando se adicionam as preparações enzimáticas da presente invenção. Neste intervalo de pH, as preparações enzimáticas possuem actividade catalítica aceitável e podem evitar a utilização de aditivos para alterar o pH.

De modo a remover as partículas grosseiras, a suspensão pode ser então centrifugada ou decantada a 350-450 G durante cerca de 10-15 minutos.

Noutra forma de realização da presente invenção, pode ser utilizada uma suspensão de cereal pré-processado. A suspensão de cereal pré-processado é definida como aquela que é primeiro preparada de acordo com os métodos divulgados na Patente US N° 5686123. A suspensão de farinha de cereal é tratada com  $\beta$ -amilase num primeiro passo de tratamento enzimático que cria especificamente unidades de maltose e não possui actividade de glucanase e proteinase, para uma viscosidade de 3-0,1 Pas na taxa de cisalhamento de 10-100 s<sup>-1</sup>. Depois, a suspensão é tratada com  $\alpha$ -amilase num segundo passo de tratamento enzimático que cria especificamente unidades de maltose e não possui actividade de glucanase e proteinase, para uma viscosidade <0,5 Pas na taxa



de cisalhamento de  $10-100\text{ s}^{-1}$ . Esta suspensão de cereal pré-processado pode ser então tratada ainda pelas preparações enzimáticas da presente invenção. Opcionalmente, a suspensão de cereal pré-processado pode ser homogeneizada e/ou submetida a tratamento UHT.

A suspensão de substrato de cereal é tratada com as preparações enzimáticas sob temperaturas de operação cuidadosamente reguladas. A temperatura é seleccionada para favorecer o desempenho enzimático permitindo taxas hidrolíticas rápidas e boa estabilidade enzimática. É geralmente empregue uma temperatura desde cerca de  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  até uma temperatura abaixo da qual iria desnaturar a enzima ou combinação de enzimas, de um modo preferido, desde cerca de  $50\text{ }^{\circ}$  a cerca de  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  dependendo da enzima. A temperaturas mais baixas, a actividade enzimática pode ser baixa e a temperaturas mais elevadas a estabilidade enzimática pode ser baixa. Consequentemente, a temperatura da reacção catalítica é seleccionada para otimizar a produção dos produtos finais, embora mantendo a estabilidade da preparação enzimática. A presente invenção é também aplicável a enzimas de degradação de amido termoestáveis, em cujo caso as condições de operação podem ser adaptadas às características dessas enzimas.

Uma combinação de várias hidrolases é introduzida numa suspensão de substrato de cereal numa quantidade suficiente para hidrolisar ligações  $\alpha$ -glicosídicas dos constituintes na suspensão de substrato de cereal para proporcionar um produto final com a viscosidade desejada. A combinação de enzimas e a quantidade de cada enzima específica resulta em suspensões que contêm açúcares diferentes, mas também em quantidades diferentes. Um teor elevado em açúcares de baixo peso molecular, tais como a maltose e a glucose irão produzir uma suspensão de

produto final com menos viscosidade. Em contraste, um teor mais elevado de maltodextrina, que é considerada uma molécula de peso molecular mais elevado, produz um produto com maior viscosidade que pode ser utilizado em sopas ou iogurtes devido à consistência mais espessa. Consequentemente, variar o tipo e/ou a quantidade das enzimas na mistura irá produzir produtos especialmente concebidos. Utilizando uma combinação específica de enzimas ajuda a padronizar o processo, de modo a que o produto final esteja relacionado com a combinação enzimática com a qual o tempo de reacção e outros parâmetros do processo não afectam grandemente o produto final. Ao realizar a presente invenção, é geralmente vantajoso empregar entre cerca de 1 a cerca de 100 mL de preparação enzimática por quilograma de aveias ou outro material em grão que constituam a suspensão de substrato de cereal. A suspensão pode ser tratada com a preparação enzimática para produzir um produto final que possui a viscosidade próxima da viscosidade da água ou de cerca de 10 mPas a cerca de várias centenas de mPas numa taxa de cisalhamento de cerca de 500 a cerca de 1000 s<sup>-1</sup>.

De um modo geral, o grão que é incorporado na suspensão de farinha do cereal pode ser qualquer material de grão inicial, incluindo, mas não limitado a aveias, cevada, arroz, trigo, milho, centeio, sorgo, triticale e milheto. De um modo preferido, o grão é aveia. Como referido acima, as aveias possuem propriedades que as tornam especialmente desejáveis de um ponto de vista do consumidor devido às grandes quantidades de  $\beta$ -glucanos de elevado peso molecular que são hidrocolóides naturais. Em suspensões produzidas por hidrólise enzimática com as preparações enzimáticas da presente invenção, os  $\beta$ -glucanos encontrados nas aveias funcionam como estabilizadores indígenas. Por isso, a suspensão de cereais da presente invenção pode ser

utilizada em alimentos para efeitos de espessamento, gelificação e estabilização da emulsão.

A doçura de uma suspensão de enzima modificada ou de uma suspensão de cereais melhorada homogénea e estável pode ser regulada e/ou manipulada utilizando preparações enzimáticas apropriadas. De facto, as preparações enzimáticas da presente invenção podem ser introduzidas em vários passos para produzir o produto final à medida dos requisitos. Uma preparação enzimática compreendendo  $\alpha$ - e  $\beta$ -amilase pode produzir um nível elevado de maltose. Com um segundo tratamento de uma preparação enzimática compreendendo amiloglucosidase e/ou glucose isomerase a maltose pode ser convertida em glucose e frutose. A produção da glucose, e, particularmente, da frutose irá resultar numa suspensão mais doce do que uma contendo principalmente maltose. Uma vantagem significativa de uma suspensão compreendendo frutose é que pode ser consumida por diabéticos sem efeitos adversos.

O tipo específico de açúcar afecta não apenas as propriedades da suspensão mas também as propriedades organolépticas de produtos produzidos utilizando as suspensões. Através da alteração do perfil de açúcar, é possível conceber à medida suspensões que produzem produtos finais possuindo propriedades funcionais, tal como viscosidade; propriedades nutricionais e teor em taxa de açúcar para corresponder às necessidades do utilizador final.

A actividade enzimática pode ser descontínua ou terminada na suspensão de cereais modificada pela enzima ou a suspensão de cereais tratada com enzima através de qualquer método bem conhecido na técnica, incluindo desnaturação, centrífuga, cromatografia para enzimas livres e/ou remoção da suspensão do

contacto com enzimas imobilizadas. De um modo preferido, a reacção enzimática é terminada por aquecimento da suspensão de cereais para, pelo menos, 80 °C e, de um modo preferido, entre cerca de 80° a 90 °C.

Como uma alternativa a actividade enzimática pode ser terminada de forma descontínua durante os passos de processo final que melhoram a estabilidade em armazenamento do produto. Os passos do processo representativo final podem incluir: remoção de partículas grosseiras por centrifugação ou decantação; homogeneizando a suspensão tratada com enzima a uma temperatura de cerca de 42 a cerca de 45 °C, a uma pressão de cerca de 200 a cerca de 250 bar; ou submetendo o produto a tratamentos de Temperatura Ultra Elevada (UHT) divulgados em *Food Engineering and Dairy Technology*, H. G. Kessler, Verlay A. Kessler, 1981, Capítulo 6, pp. 139-207, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência. Após UHT, o produto pode ser empacotado em condições de assepsia. Processos adicionais para prazos de validade melhorados podem incluir pasteurização e refrigeração até serem utilizados; ou o produto final pode ser evaporado e subsequentemente seco por aspersão para produzir um pó estável.

As suspensões de cereais de acordo com a invenção podem ser utilizadas nos mesmos campos dos produtos divulgados na Patente U.S. N° 5686123, que é um substituto do leite, como a base de ou um aditivo na preparação de gelado, papa, iogurte, batidos de leite e lanches.

A invenção será agora descrita em mais detalhe pelos seguintes exemplos não limitativos.

## EXEMPLO 1

Os flocos de aveia pré-gelatinizadas foram moídos em ambiente húmido a uma temperatura desde cerca de 52 ° a cerca de 63 °C. A concentração da suspensão foi de cerca de 10 a cerca de 15% p/v.

Uma preparação enzimática de acordo com a invenção que compreende uma mistura de  $\beta$ -amilase (Genencor Intl., Rochester, NY, EUA, ou Rhodia Ltd, Cheshire, RU) e  $\alpha$ -amilase endo-actuante, e. g. Fungamil (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) ou Mycolase (Genencor Intl., Rochester, NY, EUA), foi adicionada à suspensão de cereal a uma concentração de aproximadamente 2 mL por kg de aveias e a uma temperatura de cerca de 54° a cerca de 57 °C. A concentração destas enzimas na preparação enzimática foi de cerca de 1400 a cerca de 1600 DP° e cerca de 30 a cerca de 70 AU (unidades de amilase) por mL, respectivamente. A preparação enzimática foi deixada actuar durante cerca de 1 hora ou até a viscosidade da suspensão cair desde cerca de 20 a cerca de 40 mPas a uma taxa de fragmentação de cerca de 700 s<sup>-1</sup>. A maior parte do amido de aveia (60-70%) foi convertido em maltose e o resto estava presente como maltodextrinas (passo 1). Depois (no passo 2), foi adicionada outra enzima exo-actuante, e. g. amiloglucosidase AMG (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) ou Optidex (Genencor Intl., Rochester, NY, EUA), a uma dosagem de aproximadamente 600 AGU (unidades de amiloglucosidase) por kg de aveias. A reacção foi terminada quando foi produzida a quantidade desejada de glucose. Por exemplo, 30 minutos após a adição de amiloglucosidase (glucoamilase), a suspensão continha quantidades iguais de maltose e glucose enquanto o conteúdo de maltose foi de 50% da suspensão no passo 1. O teor em maltose foi elevado no passo 1 e a amiloglucosidase hidrolisou

rapidamente este substrato. Como o teor em maltose diminuiu, a maltodextrina tornou-se o substrato preferido e ficou também mais hidrolisada. Na conversão total, todo o amido foi convertido em glucose.

A suspensão foi depois aquecida de cerca de 85° a cerca de 90 °C, para inactivar as enzimas. O produto foi decantado para remover o excesso de fibra não solúvel e homogeneizado. Opcionalmente, o produto pode ser tratado com UHT e assepticamente embalado, pasteurizado e mantido refrigerado até a utilização ou é evaporado e subsequentemente seco por aspersão para produzir um pó estável.

## EXEMPLO 2

Os flocos de aveia pré-gelatinizados foram moídos como no Exemplo 1. Uma preparação enzimática de acordo com a invenção que compreendeu uma mistura de  $\beta$ -amilase de cevada (Genencor Intl., Rochester, NY, EUA; ou Rhodia Ltd, Cheshire, RU),  $\alpha$ -amilase, e. g. Fungamil (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) ou Mycolase (Genencor Intl., Rochester, NY, EUA) e amiloglucosidase, e. g., AMG (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) ou Optidex (Genencor Intl., Rochester, NY, EUA) foi adicionada à suspensão numa dosagem de cerca de 3 a cerca de 4 mL por kg de aveias e a uma temperatura de cerca de 54° a cerca de 57 °C. A concentração destas enzimas na preparação enzimática foi de cerca de 700 a cerca de 900 DP°, de cerca de 1 a cerca de 35 AU (unidades de  $\alpha$ -amilase) e de cerca de 200 a cerca de 350 AGU por mL, respectivamente. A preparação enzimática foi deixada a actuar durante cerca de 1-2 horas ou até a viscosidade da suspensão cair de cerca de 20 a cerca de

40 mPas a uma taxa de fragmentação de cerca de  $700\text{ s}^{-1}$ . Finalmente, a suspensão foi aquecida e tratada como no Exemplo 1.

#### EXEMPLO 3

Foi preparada uma suspensão de aveias como na Patente U.S. Nº 5686123, é tratada com uma preparação enzimática de acordo com a invenção e que compreendia  $\beta$ -amilase de cevada (Genencor Intl., Rochester, NY, EUA; ou Rhodia Ltd, Cheshire, RU) e pululanase, uma enzima desramificadora, e. g. Promozyme (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca), a uma concentração de aproximadamente 2 mL por kg de aveias. Alternativamente, a suspensão foi tratada com uma enzima desramificadora, tal como pululanase, e. g. Promozyme (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca), a uma concentração de aproximadamente 800 PU por kg de aveias. Além disso, as condições foram as mesmas do Exemplo 1. O produto continha maltose elevada e essencialmente não continha maltodextrinas.

#### EXEMPLO 4

Foi preparada uma suspensão de aveias como na Patente U.S. Nº 5686123 e foi tratada com a mesma preparação enzimática ou com amiloglucosidase como no Exemplo (como no passo 2). O produto continha uma quantidade decrescente de maltodextrinas e uma quantidade crescente de glucose à medida que a reacção hidrolítica prosseguia.

#### EXEMPLO 5

A qualquer dos produtos dos Exemplos 1, 2, 3 e 4, *i. e.*, que continham glucose, foi adicionada uma preparação enzimática de acordo com a invenção que compreendeu amiloglucosidase de cerca de 50 a cerca de 60 AGU por mL, *e. g.*, AMG (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) ou Optidex (Genencor Intl., Rochester, NY, EUA) e glucose isomerase (cerca de 3000 GIU por mL), a uma concentração de cerca de 18 a cerca de 70 mL por kg de aveias ou apenas glucose isomerase, *e. g.* Spezyme GI (Genencor Intl., Rochester, NY, EUA) ou Sweetzyme (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca), a uma concentração de cerca de 50000 a cerca de 200000 GIU (unidades de glucose isomerase). Em duas (2) horas, 25% da glucose foi convertida em frutose.

#### EXEMPLO 6

Os flocos de aveias pré-gelatinizados foram moídos a uma temperatura de cerca de 52 °C a cerca de 63 °C. Uma preparação enzimática de acordo com a invenção, que compreendeu uma mistura de  $\beta$ -amilase (Genencor Intl., Rochester, NY, EUA; ou Rhodia Ltd, Cheshire, RU) e  $\alpha$ -amilase endo-actante, *e. g.* Fungarnyl (Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dinamarca) ou Mycolase (Genencor Intl., Rochester, NY, EUA) foi adicionada à suspensão de cereal a uma concentração de aproximadamente 2 mL por kg de aveias e a uma temperatura de cerca de 54° a cerca de 57 °C. A concentração destas enzimas na preparação enzimática foi cerca de 1400 a cerca de 1600 DP° e de cerca de 1 a cerca de 8 AU (unidades de  $\alpha$ -amilase) por mL, respectivamente. A preparação enzimática foi deixada actuar durante aproximadamente 2 horas ou até a viscosidade da suspensão cair cerca de 45 a cerca de 65 mPas a



uma taxa de fragmentação de cerca de  $700 \text{ s}^{-1}$ . Um terço do amido foi convertido em maltose enquanto o resto estava presente como maltodextrina. O produto foi bastante espesso devido ao elevado teor em maltodextrina. Finalmente, a suspensão foi tratada como no Exemplo 1.

Lisboa, 10 de Fevereiro de 2011

## **REIVINDICAÇÕES**

1. Suspensão de cereal de aveia modificada por enzimas compreendendo unidades de maltose e maltrodextrina e  $\beta$ -glucanos intactos, sendo a referida suspensão de cereal de aveia modificada por enzimas preparada pelo método que compreende os passos de:
  - (i) proporcionar uma suspensão de substrato de cereal de aveia,
  - (ii) proporcionar uma composição de enzima compreendendo  $\beta$ -amilase e  $\alpha$ -amilase, e
  - (iii) tratar a referida suspensão de substrato de cereal de aveia (i) com a referida composição de enzima (ii), em que as referidas enzimas  $\beta$ -amilase e  $\alpha$ -amilase são introduzidas simultaneamente.
2. Suspensão de cereais modificados por enzima de acordo com a reivindicação 1, em que a preparação enzimática está isenta de actividade de glucanase ou protease.
3. Método de preparar uma suspensão de cereal de aveia modificada compreendendo unidades de maltose e  $\beta$ -glucanos intactos através dos passos de:
  - (i) proporcionar uma suspensão de substrato de cereal de aveia;

- (ii) proporcionar uma composição de enzima compreendendo  $\beta$ -amilase e  $\alpha$ -amilase, e
  - (iii) tratar a referida suspensão de substrato de cereal de aveia (i) com a referida composição de enzima (ii), em que as referidas enzimas  $\beta$ -amilase e  $\alpha$ -amilase são introduzidas simultaneamente, e
  - (iv) realizar, pelo menos, um passo de finalização na suspensão de cereal de aveia tratada com enzima do passo (iii).
4. Método de acordo com a reivindicação 3, em que a preparação enzimática está isenta de actividade de glucanase ou de proteinase.
5. Método de acordo com a reivindicação 3, em que a suspensão tratada com enzima do passo (iii) tem a actividade enzimática terminada antes de realizar o passo do processo de finalização.
6. Método de acordo com a reivindicação 3, em que o passo (iv) compreende, pelo menos, um processo de finalização seleccionado do grupo consistindo em homogeneização, tratamento de temperaturas ultra elevadas, pasteurização, refrigeração, evaporação e secagem por aspersão.
7. Método de acordo com a reivindicação 3, em que a suspensão de substrato de cereal do passo (i) é ainda tratada por remoção das partículas de fibra grosseiras.

8. Método de acordo com a reivindicação 3, em que a suspensão de substrato de cereal do passo (i) foi preparada por moagem dos flocos de cereais, cereais tratados com calor ou tratados com água até caldo e suspensão do caldo de cereais em água para formar uma suspensão.
9. Método de acordo com a reivindicação 3 compreendendo ainda, a descontinuação da actividade enzimática na suspensão tratada com a enzima do passo (iii) antes do passo (iv).
10. Método de acordo com a reivindicação 3 compreendendo ainda, o tratamento com calor da suspensão tratada com enzima do passo (iii) para solubilizar o amido resistente, arrefecendo a suspensão até uma temperatura que é adequada para a actividade enzimática e tratando com uma preparação enzimática para hidrolisar ainda mais o amido resistente.
11. Produto preparado pelo método de acordo com uma das reivindicações 3 a 10.

Lisboa, 10 de Fevereiro de 2011

## **RESUMO**

### **"SUSPENSÕES DE CEREAIS MODIFICADAS POR ENZIMAS"**

A presente invenção proporciona métodos eficientes, selectivos e económicos para produzir suspensões de cereais possuindo o aroma e/ou sabor de cereais naturais e para modificar a viscosidade e/ou tipo de açúcar de suspensões de cereais. Os métodos incluem o tratamento de uma suspensão de substrato de cereal com uma preparação enzimática que compreende, pelo menos, uma hidrolase possuindo a capacidade de hidrolisar ligações  $\beta$ -glicosídicas e não possuindo efeito de glucanase e proteinase. A hidrolase pode ser seleccionada do grupo consistindo em  $\beta$ -amilase,  $\alpha$ -amilase, amiloglucosidase e pululanase, com a condição de que quando a preparação enzimática compreende  $\beta$ -amilase ou  $\alpha$ -amilase existe sempre uma mistura de, pelo menos, uma outra das hidrolases  $\beta$ -glicosídicas. Adicionalmente às hidrolases acima identificadas, as preparações enzimáticas da presente invenção podem ainda compreender uma isomerase, tal como glucose isomerase.