



INSTITUTO NACIONAL
DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

(11) Número de Publicação: **PT 1150577 E**

(51) Classificação Internacional:

A23L 1/522 (2006.01) **A61K 36/64** (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01) **A61K 47/36** (2006.01)
C12N 11/10 (2006.01)

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

(22) Data de pedido: **2000.01.14**

(30) Prioridade(s): **1999.01.14 AU PP81689**

(43) Data de publicação do pedido: **2001.11.07**

(45) Data e BPI da concessão: **2006.10.19**
012/2006

(73) Titular(es):

**FOOD TECHNOLOGY INNOVATIONS PTY
LIMITED**

**G13 BIOLOGICAL SCIENCES BUILDING,
UNIVERSITY OF NEW SOUTH WALES NSW
2052**

AU

(72) Inventor(es):

PATRICIAL, LYNNE CONWAY

IAN, LEWIS BROWN

XIN WANG

RACHEL, JANE LUCAS

AU

AU

AU

AU

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS

RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **PREPARAÇÕES MICROBIANAS MELHORADAS**

(57) Resumo:

RESUMO

"PREPARAÇÕES MICROBIANAS MELHORADAS"

Preparações microbianas tendo potencial de crescimento/produção aumentado, ou razão de sobrevivência/recuperação aumentada num produto, compreendendo a preparação micróbios crescidos ou cultivados em meio baseado em ou contendo amido resistente; processos para a produção de preparações microbianas; e produtos contendo as preparações microbianas.

DESCRIÇÃO**"PREPARAÇÕES MICROBIANAS MELHORADAS"****CAMPO TÉCNICO**

A presente invenção diz respeito geralmente a um processo de preparação de uma preparação microbiana contendo micróbios tendo no seu uso razões de sobrevivência/recuperação aumentadas. As preparações microbianas obteníveis pelo processo são particularmente adequadas para inclusão em preparações pré-bióticas e probióticas e produtos incluindo alimentos, alimentação, produtos nutracêuticos e farmacêuticos contendo microorganismos probióticos e produtos fermentados por microorganismos adicionados.

TÉCNICA ANTERIOR

Produtos probióticos, por exemplo soluções, pós, comprimidos e cápsulas são administrados oralmente para melhoramento da saúde. De modo semelhante os alimentos são consumidos não apenas para subsistência, mas também para benefícios na saúde adicionados tais como através da adição de microorganismos probióticos. Os alimentos para animais estão também a ser preparados com microorganismos probióticos adicionados de modo a assistir o crescimento e desempenho de animais. Tendências recentes do consumo de composições probióticas para benefícios na saúde têm

conduzido ao uso de microorganismos probióticos numa variedade de preparações, bem como à inclusão numa larga gama de alimentos processados e produtos de alimentação, incluindo produtos à base de leite processados. Os microorganismos são também adicionados como culturas iniciadoras de maneira a ser produzida uma gama de alimentos fermentados, e. g., leite, carne, produtos vegetais.

Conforme usado nesta descrição, um probiótico ou microorganismo probiótico é um suplemento alimentar microbiano vivo que afecta beneficemente o animal hospedeiro pelo melhoramento do seu equilíbrio microbiano intestinal. Esta é a definição proporcionada por R. Fuller (AFRC Institute of Food Research, Reading Laboratory, RU) em "Probiotics in Man and Animals - A Review" *in Journal of Applied Bacteriology*, **66** (1989) 365-378, e tem sido subsequentemente estendida para incluir suplementos e alimentos para humanos. Um probiótico ou microorganismo probiótico também inclui um suplemento microbiano vivo ou preparação farmacêutica que pode ser entregue à cavidade nasal ou tracto vaginal o que afecta beneficemente o animal hospedeiro melhorando o seu equilíbrio microbiano no respectivo sítio de entrega.

A constituição e quantidade da microflora intestinal pode ser influenciada por condições ou stresse induzidos por doença, estilo de vida, viagem e outros factores. Se os microorganismos que afectam positivamente a saúde e bem-estar do indivíduo poderem ser encorajados a povoar o

intestino grosso, isto deverá melhorar o bem-estar fisiológico do hospedeiro.

A introdução de microorganismos benéficos, ou probióticos, é normalmente conseguida pela ingestão dos microorganismos em alimentos, bebidas, produtos lácteos fermentados tais como iogurtes, cápsulas, confeitos e outras formas de um tal modo que o organismo chega numa condição viável ao intestino grosso ou outro sítio de interesse no hospedeiro.

Um problema com a inclusão de microorganismos probióticos em produtos alimentares processados é que os microorganismos muitas vezes não podem sobreviver no produto alimentar durante qualquer intervalo de tempo. Durante a produção e armazenamento dos produtos alimentares, existe muitas vezes uma diminuição substancial em numerosos microorganismos viáveis. Por exemplo, a vida estável usual de produtos baseados no leite é calculada no período de tempo anterior à deterioração do produto. Quando microorganismos probióticos são adicionados a estes produtos, a vida estável indicada para o produto pode não ser aplicável com respeito à entrega do número desejado de microorganismos ao intestino para se obter o requerido efeito benéfico.

Brown *et al.* reportaram que se ratos ingerem microorganismos benéficos em conjunto com amido de mais de alta amilose (um pré-biótico), um maior número de organis-

mos benéficos pode ser encontrado nas suas fezes; em "High amylose maize starch as a versatile prebiotic for use with probiotic bacteria" in *Food Australia*, **50(12)** (1998) 603-610. Os seus experimentos indicam que os grânulos de amido actuam como agentes de suporte para proteger os microorganismos das condições/stresses hostis no tracto gastrointestinal.

Outros usos de micróbios incluem biocontrolo e biorremediação. As preparações microbianas que incluem micróbios adequados para estes usos tendo potencial de crescimento/produção aumentado, ou razões de sobrevivência/recuperação aumentadas serão uma vantagem. Por exemplo, certas estirpes de bifidobactérias e acidófilos são activas contra *Escherichia coli* e *Salmonella spp* o que significa que as bactérias têm aplicações como agentes de biocontrolo. Outros micróbios também têm aplicações de biocontrolo - por exemplo, vários fungos e espécies de *Bacillus*. Além disso, as pseudomonas são conhecidas como sendo eficazes para a biorremediação e a presente invenção é aplicável para a promoção da sua sobrevivência. Um outro micróbio de biorremediação comumente usado é *Alcaligenes*.

Os presentes inventores fizeram a surpreendente descoberta de que a inclusão de amido resistente na forma de, ou derivado de, amidos contendo fibra dietética, no meio de crescimento para os microorganismos, pode aumentar o crescimento e produção dos microorganismos, bem como aumentam a sobrevivência de microorganismos nas preparações

microbianas ou culturas iniciadoras e em alimentos e produtos de alimentação durante a produção e ao longo da vida estável destes produtos e melhoram a razão de sobrevivência dos micróbios durante o trânsito através do tracto digestivo.

Fibra dietética é definida conforme medido pela AOAC (Association of the Official Analytical Chemistry), fibra dietética Total Internacional em alimentos: método gravimétrico enzimático [Método 985.29]. Assoc. Off. Anal. Chemists, Official Methods of Analysis, 16^a Ed., Arlington VA., EUA, 1995. Uma outra adição do amido resistente às preparações microbianas após crescimento do micróbio também aumenta ainda a robustez dos micróbios, conduzindo por conseguinte à sobrevivência aumentada dos microorganismos. A descoberta é também aplicável às preparações de biocontrolo e biorremediação bem como a alimento fermentado pela adição de microorganismos, culturas iniciadoras, visto que mais culturas iniciadoras robustas também podem ser produzidas pelo crescimento em meio de amido resistente e/ou adição de amido resistente a produtos subsequentes conforme acima descrito.

REVELAÇÃO DA INVENÇÃO

De acordo com um primeiro aspecto da presente invenção é proporcionado um processo de preparação de uma preparação microbiana tendo uma razão de sobrevivência/-recuperação aumentada num produto, compreendendo o processo

o crescimento ou cultura de micróbios em meio baseado em ou contendo amido resistente e colhendo os micróbios cultivados, tendo os micróbios colhidos uma razão de sobrevivência/recuperação aumentada quando incorporados subsequentemente num produto quando comparado com os mesmos micróbios crescidos ou cultivados num meio sem amido resistente.

Preferivelmente, o produto é um alimento, alimentação, produto nutracêutico, farmacêutico, de biocontrole ou de biorremediação.

Uma forma de amido resistente particularmente adequada para a presente invenção é amido contendo amido resistente, particularmente amidos de maís de alta amilose ou materiais derivados de amidos de maís de alta amilose.

Foi encontrado que o crescimento em meio baseado em, ou contendo, amido resistente parece aumentar a capacidade dos micróbios se ligarem a amido resistente adicional adicionado ao produto aumentando por conseguinte o potencial de crescimento/produção, ou a razão de sobrevivência/recuperação aumentada dos micróbios.

Os micróbios usados no processo da presente invenção ou os micróbios na preparação microbiana melhorada obtenível por um processo da presente invenção podem ser particularmente resistentes a arejamento, corte, secagem por congelação, congelação, secagem incluindo alta, média e baixa actividade em água, temperaturas elevadas, tempera-

turas baixas, pressão e flutuações de pressão, pH baixo, pH alto, ácidos da bÍlis, humidade, osmolaridade alta ou baixa, sal alto ou suas combinações.

Os micrÓbrios usados no processo da presente invenção ou a preparação microbiana obtenÍvel por um processo de acordo com a presente invenção é particularmente adequada para uso em probióticos, culturas iniciadoras, agentes de biocontrolo ou de biorremediação.

De acordo com um segundo aspecto da presente invenção é proporcionada uma preparação microbiana contendo micrÓbrios tendo uma razão de sobrevivência/recuperação aumentada num produto quando comparada com os mesmos micrÓbrios crescidos ou cultivados num meio sem amido resistente preparável pelo processo de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção.

De acordo com um terceiro aspecto da presente invenção é proporcionado um produto contendo micrÓbrios tendo uma razão de sobrevivência/recuperação aumentada quando comparada com os mesmos micrÓbrios crescidos ou cultivados num meio sem amido resistente, incluindo o produto uma preparação microbiana de acordo com o segundo aspecto da presente invenção.

Preferivelmente, o produto é um alimento, alimentação, produto nutracéutico, farmacéutico, de biocontrolo ou de biorremediação.

De acordo com um quarto aspecto da presente invenção é proporcionado o uso de amido resistente em meio de cultura microbiano para produzir micróbios que quando subsequentemente usados num produto após serem colhidos dos meios têm uma razão de sobrevivência aumentada quando comparada com os mesmos micróbios crescidos ou cultivados em meios sem amido resistente.

Uma forma de amido resistente particularmente adequado para a presente invenção é amido contendo amido resistente. Preferivelmente, os amidos têm um conteúdo de amilose de pelo menos 40% (m/m). Numa forma preferida, o amido é de mais tendo um conteúdo de amilose de pelo menos 70% (m/m), pelo menos 80% (m/m) ou pelo menos 90% (m/m). O amido também pode ser quimicamente, fisicamente ou enzimaticamente tratado ou modificado. A modificação química pode ser por oxidação, ligação cruzada, eterificação, esterificação, acidificação, dextrinização ou suas misturas.

Os amidos também podem ser tratados para aumentar o conteúdo de amido resistente por numerosos meios físicos ou químicos. Um meio preferido é tratar por aquecimento o amido na presença de humidade (tratamento por calor-humidade) que pode ser conseguido por numerosos processos incluindo aquecimento sob pressão negativa, atmosférica ou positiva sob humidade elevada, ou técnicas de ciclização através de diferentes temperaturas e pressões. O aquecimento pode ser na ordem de 100 a 180 °C, preferivelmente

cerca de 120 a 150 °C, e os níveis de humidade de 10 a 80%, preferivelmente 20 a 60%. Sujeição repetida a autoclave e arrefecimento rápido também podem ser usados para aumentar o conteúdo de amido resistente de amidos. Será apreciado que estes processos e condições podem ser mudados para alcançar o aumento desejado do nível de amido resistente no amido a ser tratado.

O tratamento também pode ser por extracção por solvente para remover gorduras e/ou minerais do amido.

Há uma variedade de microorganismos probióticos que são adequados para uso nesta invenção incluindo leveduras tais como *Saccharomyces*, e bactérias tais como os géneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Leuconostoc*, *Peptostreptococcus* e *Lactobacillus*. A invenção não está, contudo, limitada a estes microorganismos particulares.

Preferivelmente, as culturas iniciadoras incluem, mas sem constituir limitação, bactérias de ácido láctico incluindo lactobacilos, lactococos e estreptococos, leuconostos e leveduras.

Preferivelmente, os microorganismos para uso em produtos de biocontrolo ou biorremediação incluem bifidobactérias, acidófilos, fungos, espécies *Bacillus*, pseudomonas e alcalígenos. Será apreciado, contudo, que outras

espécies de microorganismos deverão ser também candidatos adequados para uso de acordo com a presente invenção.

Tais arranjos também podem incluir microorganismos de estirpes ou espécies diferentes, incluindo não utilizadores de amido, para interagir e demonstrar crescimento e/ou actividade melhorada no intestino grosso, tracto nasal ou tracto vaginal.

Numa forma de realização preferida dos primeiro, segundo, terceiro e quarto aspectos da presente invenção, as preparações microbianas são culturas iniciadoras ou preparações probióticas que podem ser líquidas, congeladas ou secas. As preparações também podem incluir alimentos e produtos de alimentação contendo outros aditivos microbianos. Estes produtos incluem produtos à base de fluidos ou à base de sólidos. Os produtos alimentares à base de fluido incluem produtos à base de leite onde o ingrediente edível é um ou mais ingredientes à base de leite incluindo leite completo, sólidos de leite, gordura de leite, nata, leite seco não gordo, qualquer outro componente ou derivado do leite que possa ser usado em produtos à base de leite, fluidos à base de leite, extractos de cereal e planta tais como bebidas à base de soja e aditivos. Os produtos alimentares à base de sólidos incluem barras de refeição ligeira («snack bars»), cereais de pequeno-almoço, pão, confeitos, produtos alimentares extrudidos, barras de muesli, bolos de passas, biscoitos, peletes alimentares, produtos alimentares revestidos, comprimidos, aditivos

alimentares, suplementos para a saúde («health supplements») e preparações farmacêuticas.

Os produtos alimentares de acordo com o terceiro aspecto da presente invenção incluem qualquer produto alimentar que seja adequado para conter e entregar microorganismos probióticos. Exemplos incluem, mas sem constituir limitação, materiais alimentares, bebidas de fruta, gelados de água, confeitos, revestimentos ou coberturas, iogurtes, bebidas de iogurte, bebidas não fermentadas, bebidas de leite aromatizadas, bebidas de leite modificado, sorvete cremoso e sobremesas de laticínios.

Os métodos padrão empregues pela técnica podem ser usados para preparar produtos alimentares, de alimentação, nutracêuticos ou farmacêuticos de acordo com o quarto aspecto da presente invenção. O amido resistente pode ser adicionado separadamente, em combinação com um ou mais dos ingredientes que fazem parte do produto alimentar. O amido resistente quando adicionado separadamente pode interagir positivamente e/ou sinergisticamente com outros ingredientes nos produtos alimentares, de alimentação, nutracêuticos ou farmacêuticos.

O aumento na razão de sobrevivência dos micróbios no produto diz respeito a um aumento em relação à razão de sobrevivência esperada do mesmo micróbio num produto semelhante que não contém os micróbios crescidos em amido resistente.

Numa forma preferida, o amido resistente é a gama Hi-maize™ e Culture Pro™ de produtos de amido resistente. O amido resistente pode ser usado em meio de crescimento numa concentração de cerca de 0,01 a 10% (m/m) e em subsequentes adições durante a preparação das preparações microbianas e a produtos alimentares, de alimentação, nutracêuticos ou farmacêuticos líquidos. Preferivelmente o amido resistente é usado a 0,1 a 5% (m/m) e mais preferivelmente a cerca de 1% (m/m). O amido contendo amido resistente e/ou fibra dietética pode ser usado em preparações microbianas e a produtos alimentares, de alimentação, nutracêuticos ou farmacêuticos secos e preparações microbianas numa concentração de cerca de 0,1 a 90% (m/m) do produto ou preparação total. Preferivelmente, o amido é usado a cerca de 1 a 10% (m/m).

Foi verificado que o amido resistente é particularmente adequado em alimentos à base de fluido numa concentração de 0,1 a 5% m/v, em alimentos à base de sólidos de 0,1 a 15% (m/m), e em produtos alimentares, nutracêuticos ou farmacêuticos de 0,1 a 95% (m/m).

Uma outra vantagem do uso de amido resistente é que o amido resistente adicional também pode ser adicionado em qualquer fase durante o processamento do produto alimentar, nutracêutico ou farmacêutico. As propriedades do amido resistente não são adversamente afectadas pelos processos envolvidos na produção de produtos processados.

Uma vantagem distinta é que não há necessidade de adicionar amido resistente em forma estéril no fim do processo. O produto pode ser submetido a pasteurização ou semelhante sem preocupação de afectar adversamente os propriedades do amido.

Conforme usado nesta descrição, "amido resistente" inclui as formas definidas como RS1, RS2, RS3 e RS4 conforme definido em Brown, McNaught e Moloney, *Food Australia*, **47** (1995) 272-275. Qualquer dos amidos resistentes modificados ou não modificados ou suas misturas podem ser usados na presente invenção.

Em WO 94/03049 e WO 94/14342, são revelados amidos de amilose alta que são amidos resistentes e incluem amido de milho tendo um conteúdo de amilose de 50% (m/m) ou milho, particularmente 80% (m/m) ou milho, amido de arroz tendo um conteúdo de amilose de 27% (m/m) ou um amido de trigo tendo 35% (m/m) ou milho. Além disso, gamas de tamanho granular particular de amidos tendo um conteúdo de amilose de 50% ou milho e conteúdo de amido resistente aumentado, estes amidos incluindo milho, cevada e legumes. Esta invenção não está, contudo, limitada a estas formas de amido resistente. Por exemplo, outras formas de amido resistente são derivadas de fontes tais como bananas e tubérculos tais como batatas e suas formas modificadas.

Modificações químicas, tais como oxidação, ligação cruzada, eterificação, esterificação, acidificação,

dextrinização e semelhantes são bem conhecidas nesta técnica como sendo tratamentos químicos adequados. De modo semelhante, outras modificações podem ser incluídas fisicamente, enzimaticamente ou por outro meio bem conhecido dos peritos na técnica.

Pode também ser útil modificar o grau de susceptibilidade a enzima do amido resistente pela alteração da conformação ou estrutura do amido. Exemplos incluem afunamento# por ácido ou enzima e ligação cruzada usando reagentes difuncionais, tratamento por calor/humidade e fortalecimento térmico. Modificações do amido podem também ser realizadas por manipulação da natureza cristalina do amido. Tais métodos de modificação são conhecidos da técnica e os amidos produzidos por estes métodos serão adequados para a presente invenção.

Preferivelmente, os amidos resistentes são derivados ou obtidos a partir de milho (maís). Será apreciado, contudo, que outras fontes de amido resistente podem ser usadas na presente invenção. Exemplos incluem cereais do tipo sorgo, trigo, cevada, aveia e arroz, tubérculos do tipo batata e tapioca, legumes tais como ervilhas e outros incluindo amidos derivados de espécies de plantas geneticamente modificadas.

Conforme aqui usado, Hi-maize™ e Culture Pro™ referem-se a produtos obtidos a partir de amido de amilose alta contendo acima de 70% de amilose obtido em Starch

Australasia Limited. Amidos de amilose alta contendo amido resistente adequado para a presente invenção são descritos em AU 660560.

Ao longo desta descrição, a menos que o contexto exija de maneira diferente, a palavra "compreendem", ou variações tais como "compreende" ou "compreendendo", será entendido como implicando a inclusão de um indicado elemento, inteiro ou passo, ou grupo de elementos, inteiros ou passos, mas não a exclusão de qualquer outro elemento, inteiro ou passo, ou grupo de elementos, inteiros ou passos.

De maneira a que a presente invenção possa ser mais claramente compreendida, as formas preferidas serão descritas com referência aos exemplos e desenhos seguintes.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1 - mostra o crescimento da estirpe D de *Bifidobacterium* com e sem amido.

Figura 2 - mostra o crescimento da estirpe E de *Bifidobacterium* com e sem amido.

Figura 3 - mostra o crescimento da estirpe C de *Bifidobacterium* com e sem amido.

Figura 4 - mostra a sobrevivência/recuperação de

micróbios crescidos em amido numa bebida à base de probiótico avaliada para a estirpe C de *Bifidobacterium* que tinha crescido na presença de glucose (0,5%), ou Amido 1 (0,25%) + glucose (0,25%), ou Amido 2 (0,5%), ou Amido 2 (0,25%) + glucose (0,25%).

Figura 5 - mostra a sobrevivência/recuperação de micróbios crescidos em amido numa bebida de leite fermentado do tipo iogurte avaliada para a estirpe C de *Bifidobacterium* que tinha crescido na presença de glucose (0,5%), ou Amido 1 (0,25%) + glucose (0,25%), ou Amido 2 (0,5%), ou Amido 2 (0,25%) + glucose (0,25%).

Figura 6 - mostra a sobrevivência/recuperação de micróbios crescidos em amido em sumo de laranja avaliada para a estirpe C de *Bifidobacterium* que tinha crescido na presença de glucose (0,5%), ou Amido 1 (0,25%) + glucose (0,25%), ou Amido 2 (0,5%), ou Amido 2 (0,25%) + glucose (0,25%).

Figura 7 - mostra a sobrevivência/recuperação de micróbios crescidos em amido numa bebida à base de probiótico com a inclusão de amido resistente adicional avaliada para a estirpe C de *Bifidobacterium* que tinha crescido na presença de glucose (0,5%), ou Amido 1 (0,25%) + glucose (0,25%), ou Amido 2 (0,5%), ou Amido 2 (0,25%) + glucose (0,25%).

Figura 8 - mostra a sobrevivência/recuperação de

micróbios crescidos em amido num produto de leite fermentado do tipo iogurte com a inclusão de amido resistente adicional avaliada para a estirpe C de *Bifidobacterium* que tinha crescido na presença de glucose (0,5%), ou Amido 1 (0,25%) + glucose (0,25%), ou Amido 2 (0,5%), ou Amido 2 (0,25%) + glucose (0,25%).

Figura 9 - mostra a sobrevivência/recuperação de micróbios crescidos em amido em sumo de laranja com a inclusão de amido resistente adicional avaliada para a estirpe C de *Bifidobacterium* que tinha crescido na presença de glucose (0,5%), ou Amido 1 (0,25%) + glucose (0,25%), ou Amido 2 (0,5%), ou Amido 2 (0,25%) + glucose (0,25%).

Figura 10 - mostra a sobrevivência/recuperação das estirpes expostas a um ciclo de congelação-descongelação após crescimento na presença de amido resistente avaliada para a estirpe C de *Bifidobacterium* que tinha crescido na presença de glucose (0,5%), ou Amido 1 (0,5%), ou Amido 1 (0,25%) + glucose (0,25%).

Figura 11 - mostra a sobrevivência/recuperação das estirpes expostas a um ciclo de congelação-descongelação após crescimento na presença de amido resistente avaliada para a estirpe C de *Bifidobacterium* que tinha crescido na presença de Amido 1 (0,25%) + glucose (0,25%) com adição de mais Amido 1.

Figura 12 - mostra a sobrevivência/recuperação

das estirpes expostas a um ciclo de congelação-descongelação após crescimento na presença de amido resistente avaliada para a estirpe C de *Bifidobacterium* que tinha crescido na presença de Amido 2 (0,5%) com adição de mais Amido 1.

Figura 13 - mostra a sobrevivência da estirpe C de *Bifidobacterium* crescida na presença de glucose (0,5%), ou Amido 1 (0,25%) + glucose (0,25%), ou Amido 2 (0,5%), ou Amido 2 (0,25%) + glucose (0,25%) e em seguida colocada em vários tipos de iogurtes sem amido adicionado.

Figura 14 - mostra a sobrevivência da estirpe C de *Bifidobacterium* crescida na presença de glucose (0,5%), ou Amido 1 (0,25%) + glucose (0,25%), ou Amido 2 (0,5%), ou Amido 2 (0,25%) + glucose (0,25%) e colocada em vários tipos de iogurtes sem amido adicionado.

MODOS PARA A REALIZAÇÃO DA INVENÇÃO

Os inventores presentes verificaram que a inclusão de amido resistente em meios de crescimento microbiano e facultativamente em estádios subsequentes de produção de preparações microbianas contendo os micróbios crescidos em amido resistente resultou num aumento surpreendente e inesperado na recuperação do crescimento e/ou sobrevivência dos micróbios durante a produção e armazenamento das preparações e produtos.

EXEMPLO 1

A estirpe Lafti™ 13B de *Bifidobacterium* foi crescido anaerobicamente num meio de ágar basal (BM) suplementado com 1% (m/m) de ou de glucose ou de amido resistente (Culture Pro™). Após crescimento, as células foram colhidas das placas usando salina tamponada por fosfato (PBS) e alíquotas foram misturadas ou com PBS ou com PBS contendo os grânulos de amido (10% (m/m)). Alíquotas das misturas foram secas por congelação. A susceptibilidade das células Lafti™ 13B a pH baixo foi avaliada pela adição das misturas bacterianas antes da secagem por congelação re-hidratadas após a secagem por congelação, a tampão de glicina a um pH de 3,5. As células viáveis foram enumeradas pela determinação de unidades formadoras de colónias usando placas de Tryptone Yeast Extract Peptone (TYP) quando adicionadas a pH 3,5 e após 3 horas. A redução de viabilidade ao longo de 3 horas é apresentada no Quadro 1. Foi notado que as células crescidas na presença de amido foram mais resistentes e que a inclusão do amido aumenta ainda a resistência.

Quadro 1. Redução da viabilidade ao longo de 3 horas de células de *Bifidobacterium*

	Presença de amido após crescimento	Redução de viabilidade
Células crescidas em glucose	-	26×10^2
Células crescidas em glucose	+	15×10^2
Células crescidas em amido	-	26
Células crescidas em amido	+	5

EXEMPLO 2

A estirpe Lafti™ 13B de *Bifidobacterium* foi pré-cultivada em caldo Basal (BM) suplementado com 1% (m/v) de glucose ou de grânulos de amido de maïs de amilose alta (Culture Pro™). As culturas crescidas anaerobicamente foram inoculadas (10 µL) em BM de ágar ou em caldo, contendo ambos os meios de 1% (m/v) de glucose ou Culture Pro™. As placas foram ou inoculadas pontualmente ou por espalhamento e em seguida incubadas anaerobicamente durante 48 h. Os crescimentos em caldo ou células colhidas das placas com espalhamento foram quantificados por enumeração das unidades formadoras de colónias (CFU). O crescimento em placas inoculadas pontualmente foi quantificado por medição do tamanho da colónia bem como do tamanho da zona aclarada em redor da colónia o que era indicativo da utilização do amido pelas células de *Bifidobacterium*. Foi notado que Lafti™ 13B cresceu mais rapidamente em meio contendo amido quando pré-cultivada usando meio contendo amido e produziu colónias maiores e zonas aclaradas em placas de ágar contendo amido. Além disso, o rendimento foi maior a partir de meio contendo amido, comparado com meio de glucose, para células pré-cultivadas não só em caldo de controlo (glucose) mas também em caldo de amido.

Resultados

A recuperação de microorganismos viáveis após crescimento na presença de amido foi mais alta e mais rápida do que em controlos de glucose.

O crescimento em meio de amido aumentou o rendimento de microorganismos após exposição a condições de stresse, por exemplo, pH baixo, ácidos da bÍlis, ácidos, calor, humidade, pressão, secagem por congelação, secagem por pulverização, individualmente ou em combinação.

A pré-cultura em meio de amido antes do crescimento em meio de amido aumentou a recuperação/sobrevivência após exposição a condições de stresse conforme acima delineado, bem como aumentou o rendimento.

O crescimento em meio de amido e em seguida a adição de amido aumentou a resistência a condições de stresse conforme acima delineado.

A invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos usando dois amidos contendo amido resistente, referido como Amido 1 (cerca de 20% (m/m) de amido resistente) e Amido 2 (cerca de 60% (m/m)) que eram amidos de maÍs de amilose alta granulares, bem como numerosas estirpes de *Bifidobacterium*, referidas como estirpes A, B, C, D, E e F.

EXEMPLO 3

O crescimento e rendimento da estirpe D de *Bifidobacterium*, estirpe E de *Bifidobacterium* e estirpe C

de *Bifidobacterium* na presença de amido de maís granular natural foi estudado. A pré-cultura da estirpe foi crescida em 20 mL de caldo PYG durante 18 horas e usada para inocular (alíquotas de 0,1 mL) 20 mL de meio de crescimento PY contendo ou glucose (0,5%), ou Amido 1 (0,5%), ou Amido 2 (0,5%) ou uma mistura de Amido 1 (0,25%) + glucose (0,25%). As culturas foram incubadas numa câmara anaeróbica a 37 °C e amostradas às 0, 4, 7, 12, 24, 41, 48 e 72 horas para monitorizar o número de células viáveis determinado como unidades formadoras de colónias por mL de cultura (CFU/mL⁻¹). Os resultados apresentados na Figura 1 para a estirpe D de *Bifidobacterium* mostram que a inclusão de Amido 1 (0,25%) junto com glucose (0,25%) resultou em crescimento e rendimento aumentados da estirpe D comparando com glucose 0,5% isolada. Para a estirpe E de *Bifidobacterium* (Figura 2) o crescimento foi mais rápido em caldo de Amido 2 comparando com o controlo de glucose. O crescimento para a estirpe E foi também aumentado em caldo de Amido 1 + glucose comparando com o controlo de glucose. Um padrão de crescimento e rendimento diferentes para a estirpe C de *Bifidobacterium* foi notado. Conforme mostrado na Figura 3, enquanto a velocidade de crescimento não foi marcadamente diferente para os vários caldos, esta estirpe quando crescida em glucose morria em massa muito rapidamente uma vez o rendimento máximo estar obtido cerca das 18 horas. A estirpe manteve um rendimento mais alto quando Amido 1 ou Amido 2 foram incluídos.

EXEMPLO 4

A sobrevivência/recuperação de micróbios crescidos em amido em alimentos foi avaliada para a estirpe C de *Bifidobacterium* que tinha sido crescida na presença de glucose (0,5%), ou Amido 1 (0,25%) + glucose (0,25%), ou Amido 2 (0,5%) ou Amido 2 (0,25%) + glucose (0,25%). As células de *Bifidobacterium* foram recolhidas após 40 horas de crescimento anaeróbico e diluídas no produto alimentar para se produzir aproximadamente 10^5 CFU por mL de alimento. Os alimentos ensaiados incluíram sumo de laranja, uma bebida à base de probiótico e um produto de leite fermentado do tipo iogurte. Os produtos alimentares contendo células da estirpe C de *Bifidobacterium* foram guardadas à temperatura ambiente (para condições de armazenamento aceleradas) e amostradas nos dias 0, 1, 2, 5 e 6 para quantificar a sobrevivência de células da estirpe C de *Bifidobacterium*. Dos resultados apresentados na Figura 4, a sobrevivência aumentada da estirpe C na bebida à base de probiótico ocorreu quando a estirpe foi previamente cultivada na presença de Amido 1 ou 2. De modo semelhante, a sobrevivência aumentada da estirpe C foi notada no produto de leite fermentado do tipo iogurte. Para células crescidas em amido (Figura 5) e em sumo de laranja para células crescidas em amido (Figura 6).

EXEMPLO 5

A inclusão de amido resistente adicional a micro-

organismos cultivados na presença de amido resistente resultou em sobrevivência aumentada quando os microorganismos foram adicionados a produtos alimentares. Isto foi investigado usando a estirpe C de *Bifidobacterium* que tinha sido crescida na presença de glucose (0,5%), ou Amido 1 (0,25%) + glucose (0,25%), ou Amido 2 (0,5%) ou Amido 2 (0,25%) + glucose (0,25%). As células de *Bifidobacterium* foram recolhidas após 40 horas de crescimento anaeróbico e misturadas com Amido 1 2,5% durante 1 hora. As células mais grânulos de amido foram em seguida recolhidas por centrifugação e adicionadas ao produto alimentar para produzirem aproximadamente 10^5 CFU por mL de alimento. Os alimentos ensaiados incluíram sumo de laranja, uma bebida à base de probiótico e um produto de leite fermentado do tipo iogurte. Os produtos alimentares contendo células da estirpe C de *Bifidobacterium* foram guardadas à temperatura ambiente (para condições de armazenamento aceleradas) e amostradas nos dias 0, 1, 2, 5 e 6 para quantificar a sobrevivência de células da estirpe C de *Bifidobacterium*. Conforme apresentado na Figura 7, a inclusão de Amido 1 adicional estendeu a sobrevivência das bactérias numa bebida à base de probiótico sem ter em conta o meio de crescimento que foi usado e, conforme visto na Figura 8, em produto de leite fermentado do tipo iogurte. O amido adicional também estendeu a sobrevivência da estirpe C em sumo de laranja (Figura 9).

EXEMPLO 6

Usando a estirpe C de *Bifidobacterium*, ratos fêmeas de 20 g foram orogastricamente entubados com uma suspensão de células colhidas de placas à base de glucose ou placas à base de Amido 1 ou Amido 2. As suspensões bacterianas foram estandardizadas a uma densidade óptica consistente correspondendo a aproximadamente 10^8 por mL de diluente. As células de *Bifidobacterium* em amostras fecais evacuadas recentemente foram enumeradas usando placas de ágar PAM e a identificação foi confirmada usando PCR. As amostras fecais foram recolhidas às 4, 10, 24 e 48 horas após a administração da bifidobactéria. Nenhuma células de bifidobactérias foram detectadas em ratos doseados com células crescidas em glucose (Quadro 2). Os ratos doseados com a estirpe C crescida em ágar de Amido 1 tinham aproximadamente $\log 7$ CFU por grama de peso líquido em fezes detectadas 4 e 10 horas após administração oral. Os números diminuíram nas amostras de 24 e 48 horas mas eram ainda detectáveis. Quando a estirpe C de *Bifidobacterium* crescida em ágar de Amido 2 foi orogastricamente doseada a ratos, aproximadamente $\log 8$ CFU por grama de peso líquido de fezes foram detectadas 4 e 10 horas após administração, com uma diminuição para as amostras de 24 e 48 horas. Foi concluído que o crescimento em ágar à base de amido resistente resulta em células de bifidobactéria que eram mais resistentes a condições *in vivo* o que deveria incluir o baixo pH do estômago, ácidos da biliar e enzimas pancreáticas.

Quadro 2. Recuperação da estirpe C de *Bifidobacterium* a partir de fezes evacuadas recentemente de ratos orogastricamente doseados com células da estirpe C de *Bifidobacterium* que tinham sido cultivadas em ou ágar de glucose, ágar de Amido 1 ou ágar de Amido 2. Os resultados expressos como CFU por grama de peso líquido de fezes

Tempo após dosagem (h)	Ágar de glucose	Ágar de Amido 1	Ágar de Amido 2
	(CFU por g de peso líquido)		
4	ND	$5,8 \times 10^6$	$2,5 \times 10^8$
10	ND	$2,5 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$
24	ND	$> 10^6$	$> 10^6$
48	ND	$> 10^5$	$> 10^5$

ND - nenhuma detectada

EXEMPLO 7

Foi mostrado que microorganismos cultivados na presença de amido resistente são mais resistentes a stresse físico conforme ilustrado pelo exemplo seguinte no qual estirpes de bifidobactérias foram expostas a um ciclo de congelação-descongelação após crescimento na presença de amido resistente. A estirpe C de *Bifidobacterium* que tinha sido crescida na presença de glucose (0,5%), ou Amido 1 (0,25%) + glucose (0,25%), ou Amido 2 (0,5%), ou Amido 2 (0,25%) + glucose (0,25%). As células de *Bifidobacterium* foram recolhidas após 40 horas de crescimento anaeróbico e as amostras foram divididas em duas. Uma porção foi congelada directamente (-20 °C) e a outra porção foi misturada com Amido 1 (2,5%) durante 1 hora. As células mais grânulos de amido foram em seguida recolhidas por

centrifugação e também congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. As células de bifidobactérias viáveis foram quantificadas após 0, 1, 2, 3 e 4 ciclos de descongelação que envolveram o descongelamento das amostras à temperatura ambiente cada dia durante 4 dias. Conforme apresentado na Figura 10, o crescimento na presença de amido resistente antes da exposição ao stresse físico aumentou a sobrevivência da bifidobactéria. Além disso, a adição de mais amido resistente antes da congelação melhorou ainda a sobrevivência das células de bifidobactérias (Figuras 11 e 12).

EXEMPLO 8

Bactérias crescidas na presença de amido resistente e subsequentemente secas por congelação antes de armazenamento a temperaturas elevadas foram mais resistentes a temperaturas elevadas do que as crescidas na ausência do amido. Três estirpes A, B e D de *Bifidobacterium* foram cada uma crescidas em fermentadores com controlo de pH. A biomassa celular foi colhida e seca por congelação. O pó seco foi em seguida guardado a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 7 dias e amostrado diariamente durante 4 dias e em seguida de novo no dia 7 para quantificar a bifidobactéria viável. Os resultados são expressos como unidades formadoras de colónias por grama de pó seco. Conforme ilustrado no Quadro 3, as células que cresceram na presença de Amido 1, sobreviveram melhor ou foram recuperadas em níveis mais altos do que as crescidas na ausência do amido resistente.

Quadro 3. Sobrevivência das estirpes A, B e D de *Bifidobacterium* em incubação a 42 °C

Tempo (d)	Estirpe A		Estirpe B		Estirpe C	
	Sem amido	Com amido	Sem amido	Com amido	Sem amido	Com amido
0	10,52	10,59	10,58	10,56	10,65	10,58
1	10,30	10,23	10,23	10,40	10,11	10,20
2	9,11	10,11	7,83	10,08	7,76	9,83
3	7,26	10,00	5,00	9,53	5,00	8,53
4	4,60	9,48	4,00	8,08	4,00	5,68
7	0,00	8,04	0,00	0,00	0,00	1,30

EXEMPLO 9

A sobrevivência de *Clostridium butyricum* foi monitorizada após crescimento em caldo sem amido adicionado. As células foram colhidas e ressuspensas em tampão de pH 3,8 contendo Amido 1 (2,5%), Amido 2 (2,5%), celulose (2,5%) ou Amido 3 (2,5%) e as células viáveis resultantes foram quantificadas após 3 horas. Os resultados são expressos como percentagem relativa à contagem viável inicial. Conforme pode ser visto no Quadro 4, a presença de Amido 2 aumentou a sobrevivência. A celulose não protegeu contra a perda de viabilidade conforme foi notado para o amido resistente.

Quadro 4. Sobrevivência de *Clostridium butyricum* crescidas na ausência de amido resistente e em seguida combinado com Amido 1, 2 ou 3 (2,5%) suspenso em tampão de pH 3,8. A perda de viabilidade foi monitorizada após 3 horas de exposição a pH 3,8

Adição de amido	Percentagem viável após 3 horas a pH 3,8
Sem amido	80,5
Amido 1	71,3
Amido 2	111,3
Celulose	ND
Amido 3	66,0

ND - nenhuma detectada

EXEMPLO 10

Foi mostrado que existe sinergia entre ingredientes alimentares tais como polissacáridos e o efeito aumentado na sobrevivência de microorganismos quando crescidos

na presença de amido resistente e/ou quando é incluído amido resistente adicional com os micróbios. Isto pode ser demonstrado pelo crescimento da estirpe C de *Bifidobacterium* na presença de glucose (0,5%), ou Amido 1 (0,25%) + glucose (0,25%), ou Amido 2 (0,5%), ou Amido 2 (0,25%) + glucose (0,25%). As células de bifidobactérias foram recolhidas após 40 horas de crescimento anaeróbico e as amostras foram divididas em duas. Uma porção foi usada directamente e a outra porção foi misturada com Amido 1 (2,5%) durante 1 hora. As células isoladas ou as células mais grânulos de amido foram em seguida recolhidas por centrifugação e ressuspensas em leites fermentados tipo iogurte os quais foram em seguida guardados à temperatura ambiente e amostrados nos dias 0, 1, 2, 5 e 6 para testagem à bifidobactéria viável. Conforme pode ser visto nas Figuras 13 e 14, existiu uma sinergia demonstrável entre a presença de polissacárido no iogurte B e o crescimento na presença de amido resistente comparando com glucose.

EXEMPLO 11

Foi estabelecido que as células bacterianas fixadas a uma superfície sobrevivem melhor a condições de stresse do que as células não fixadas. Neste exemplo, foi verificado que as células de bifidobactérias crescidas em Amido 1 resistente aderiam duas vezes melhor a grânulos de Amido 1 do que foi notado para as células crescidas em glucose. As células da estirpe C de *Bifidobacterium* cresceram em PYG durante 24 horas e após colheita por centrifugação foram ressuspensas numa solução de Amido 1

(2,5%) a pH 7,0 ou a pH 2,5. Após uma hora de incubação, a adesão dos grânulos de amido foi avaliada e em seguida o pH foi alterado de 7,0 para 2,5 e também de 2,5 para 7,0. Como pode ser visto no Quadro 5, as células da estirpe C aderiram bem em pH 7,0 mas não em pH 2,5 e, quando o pH foi mudado de 7,0 para 2,5, as células permaneceram fixadas enquanto existiu um aumento na adesão quando o pH foi aumentado de pH 2,5 para pH 7,0.

Quadro 5. O efeito do pH na adesão a Amido 1 da estirpe C de *Bifidobacterium*

Medição à 1 h		Medição às 2 h	
pH	Adesão (%)	pH	Adesão (%)
7,0	88,8	7,0	86,7
2,5	18,3	2,5	13,4
7,0	88,1	pH muda para 2,5	75,5
2,5	19,51	pH muda para 6,8	72,8

USOS

(i) As formas de realização específicas da invenção podem ser aplicadas a situações para as quais podem ser usados micróbios probióticos, incluindo o uso como agentes profilácticos e terapêuticos bem como em alimentos e composições alimentares para benefício do hospedeiro.

(ii) As formas de realização específicas da invenção podem ser aplicadas a situações para as quais podem ser usados micróbios probióticos para aplicações no tracto não digestivo como os tractos nasal e vaginal.

(iii) As formas de realização específicas da invenção podem ser aplicadas a situações que se relacionam com o biocontrole e biorremediação.

(iv) Os microorganismos probióticos podem crescer no meio à base de amido e ser usados directamente ou combinados com amido adicional após crescimento. Estas suspensões probióticas podem ser usadas directamente ou após congelamento e/ou secagem na ausência ou presença de outros aditivos.

(v) Os microorganismos probióticos descritos acima em (ii) podem ser adicionados a alimentos e alimentações quer durante quer no fim da produção.

(vi) Em aditamento aos alimentos e alimentações descritos acima em (iii), o amido também podem ser adicionado ao alimento ou alimentação antes ou depois da adição dos microorganismos probióticos.

(vii) As formas de realização específicas da invenção também podem ser aplicadas a microorganismos, incluindo culturas iniciadoras, usados para produção de alimentos fermentados em que estes microorganismos são crescidos em meio à base de amido e facultativamente misturados com amido adicional após crescimento, congelamento e/ou secagem, aumentando por esse meio a sobrevivência dos micróbios. Quando estes micróbios são adicionados como ingrediente, um adicional de amido pode ser adicionado ao alimento antes, durante ou depois da produção.

As formas de realização específicas da invenção cobrem o facto de que para muitos microorganismos diferentes, incluindo bactérias probióticas tais como bactérias de ácido láctico e bifidobactérias, na presença de amido resistente no meio de crescimento podem em preparações sólidas ou líquidas:

aumentar o crescimento e/ou rendimento do microorganismo; e

aumentar a razão de sobrevivência ou razão de recuperação dos micróbios em alimentos, alimentos para a saúde («health foods») incluindo alimentos nutracêuticos e/ou funcionais, suplementos para a saúde, alimentos e formulações alimentares desenhadas para crianças e geriatria, produtos farmacêuticos, alimentos médicos tais como preparações de alimentação entérica, alimentação animal, alimentos para animais de companhia, aquacultura, alimentos e suplementos para aves, suplementos alimentares para desporto e desempenho.

Ainda que os exemplos proporcionados digam respeito principalmente a alimentos e produtos probióticos, será apreciado que outros microorganismos úteis para aplicações diferentes, por exemplo biocontrolo e biorremediação, podem vir a ter potencial crescimento/rendimento aumentado ou razão de sobrevivência/recuperação aumentada no uso.

O crescimento e sobrevivência podem ser acen-

tuados se amido resistente adicional for adicionado aos microorganismos após o crescimento e mesmo quando for adicionado a células crescidas na ausência de amido resistente e que são subsequentemente misturadas com amido.

Além disso, os microorganismos crescidos na presença de amido resistente são mais resistentes aos stresses tais como arejamento, corte, congelação, secagem, secagem por congelação, alta temperatura, baixa temperatura, flutuações de temperatura, flutuações de pressão, alta pressão, baixa pressão, pH baixo, pH alto, humidade, condições *in vivo*.

O amido resistente, incluindo os tipos RS1, RS2, RS3 e RS4 podem ser amidos naturais contendo amido resistente e/ou suas modificações incluindo modificações não só químicas mas também enzimáticas, e/ou suas misturas. Exemplos de dois amidos diferentes foram usados nos exemplos mas um perito na técnica apreciará que outras formas de amido resistente serão também adequadas para uso na presente invenção.

O crescimento/rendimento e/ou sobrevivência ou recuperação aumentados acima citados também se aplicam à produção e armazenamento de preparações de microorganismos.

Em aditamento, foi surpreendentemente verificada uma sinergia com outros ingredientes alimentares incluindo dissacáridos, oligossacáridos e polissacáridos quando o

crescimento/rendimento e/ou sobrevivência ou recuperação de microorganismos foram monitorizados. Será apreciado que outros ingredientes alimentares tais como proteínas e gorduras podem também actuar sinergisticamente.

Foi também notado que células crescidas em amido resistente aderem melhor a grânulos de amido que por sua vez assegurará melhor a sobrevivência ou recuperação. Visto que o amido resistente tem digestibilidade reduzida, será apreciado que outros compostos indigeríveis incluindo proteínas e lípidos poderão também proporcionar crescimento/rendimento e/ou sobrevivência ou recuperação de microorganismos.

A técnica anterior tem mostrado que a presença de amido resistente em composições probióticas aumenta a sobrevivência dos microorganismos probióticos durante e após o consumo (AU 687253). Esta patente anterior pelos requerentes presentes mostra dados usando bifidobactérias com amido adicional adicionado. Em contraste, a presente invenção resulta da descoberta inesperada que as células crescidas em amido resistente são mais robustas sem a adição de mais amido. Surpreendentemente, quando os microorganismos crescem na presença de amido resistente, e podem ter amido adicional adicionado às células crescidas em amido, ocorre crescimento/rendimento e/ou sobrevivência ou recuperação aumentados do microorganismo. Quer dizer, as células microbianas crescidas na presença de amido resistente são mais robustas. Além disso, a adição de amido

resistente a células crescidas na ausência de amido podem aumentar a robustez destas células.

Será apreciado por pessoas peritas na técnica que numerosas variações e/ou modificações podem ser feitas para as formas de realização específicas da presente invenção. As formas de realização presentes são, por conseguinte, para serem consideradas a todos os títulos como ilustrativas e não restritivas.

Lisboa, 14 de Novembro de 2006

REIVINDICAÇÕES

1. Um processo de preparação de uma preparação microbiana tendo uma razão de sobrevivência/recuperação aumentada num produto, compreendendo o processo o crescimento ou cultura de micróbios em meio baseado em, ou contendo, amido resistente, e colhendo os micróbios cultivados, tendo os micróbios colhidos uma razão de sobrevivência/recuperação aumentada quando incorporados subsequentemente num produto quando comparado com os mesmos micróbios crescidos ou cultivados num meio sem amido resistente.

2. O processo de acordo com a reivindicação 2, em que o produto é seleccionado do grupo constituído por um alimento, alimentação, produto nutracêutico, farmacêutico, de biocontrolo ou de biorremediação.

3. O processo de acordo com a reivindicação 2 ou 3, em que o amido resistente é do tipo RS1, RS2, RS3 ou RS4.

4. O processo de acordo com a reivindicação 2 ou 3, em que o amido resistente é derivado de amido seleccionado do grupo constituído por maís, arroz, cevada, trigo, legumes, batatas e bananas.

5. O processo de acordo com qualquer reivindicação precedente em que o amido resistente é derivado de

um amido tendo um conteúdo de amilose de pelo menos 40% (m/m).

6. O processo de acordo com qualquer reivindicação precedente em que o amido resistente é derivado de amido de maís.

7. O processo de acordo com a reivindicação 6 em que o amido de maís tem um conteúdo de amilose de pelo menos 70% (m/m).

8. O processo de acordo com a reivindicação 6 em que o amido de maís tem um conteúdo de amilose de pelo menos 80% (m/m).

9. O processo de acordo com a reivindicação 6 em que o amido de maís tem um conteúdo de amilose de pelo menos 90% (m/m).

10. O processo de acordo com qualquer reivindicação precedente em que o amido é quimicamente, fisicamente e/ou enzimaticamente tratado ou modificado.

11. O processo de acordo com a reivindicação 10 em que a modificação química pode ser por oxidação, ligação cruzada, eterificação, esterificação, acidificação, dextrinização e suas misturas.

12. O processo de acordo com a reivindicação 10

em que o tratamento físico é tratamento por calor-humidade para favorecer ou aumentar o conteúdo em amido resistente do amido.

13. O processo de acordo com a reivindicação 10 em que o tratamento é por extracção por solvente para remover gorduras e/ou minerais do amido.

14. O processo de acordo com qualquer reivindicação precedente em que o amido resistente é usado nos meios numa concentração de 0,01 a 10% (m/m).

15. O processo de acordo com a reivindicação 14 em que o amido resistente é usado nos meios em 0,1 a 5% (m/m).

16. O processo de acordo com a reivindicação 14 em que o amido resistente é usado nos meios em 1% (m/m).

17. O processo de acordo com qualquer reivindicação precedente em que no uso os micróbios são resistentes a arejamento, corte, secagem por congelação, congelação, secagem incluindo alta, média e baixa actividade em água, temperaturas elevadas, temperaturas baixas, pressão e flutuações de pressão, pH baixo, pH alto, ácidos da biliar, humidade, osmolaridade alta, osmolaridade baixa, sal alto ou suas combinações.

18. O processo de acordo com qualquer reivindi-

cação precedente em que a preparação microbiana é um probiótico, uma cultura iniciadora, um produto de biocontrole ou de biorremediação.

19. O processo de acordo com a reivindicação 18 em que os micróbios são microorganismos probióticos dos géneros seleccionados do grupo constituído por *Saccharomyces*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Peptostreptococcus* e *Lactobacillus*.

20. O processo de acordo com a reivindicação 18 em que os micróbios são culturas iniciadoras seleccionadas do grupo constituído por bactérias de ácido láctico incluindo lactobacilos, lactococos e estreptococos, leucostos e leveduras.

21. O processo de acordo com a reivindicação 18 em que os micróbios são adequados para uso em biocontrole e biorremediação sendo seleccionados do grupo constituído por bifidobactérias, acidófilos, fungos, espécies de *Bacillus*, *pseudomonas* e alcalígenos.

22. Uma preparação microbiana tendo uma razão de sobrevivência/recuperação aumentada num produto, quando comparado com os mesmos micróbios crescidos ou cultivados num meio sem amido resistente, preparável pelo processo de acordo com qualquer das reivindicações precedentes.

23. Um produto contendo micróbios tendo uma razão de sobrevivência/recuperação aumentada, quando comparado com os mesmos micróbios crescidos ou cultivados num meio sem amido resistente, incluindo o produto uma preparação microbiana de acordo com a reivindicação 22.

24. O produto de acordo com a reivindicação 23 seleccionado do grupo constituído por um alimento, alimentação, produto nutracêutico, farmacêutico, de biocontrolo e de biorremediação.

25. O produto de acordo com a reivindicação 24 sendo um alimento, alimentação, produto nutracêutico ou farmacêutico seleccionado do grupo constituído por produtos alimentares à base de fluido, fluidos à base de água, produtos alimentares à base de cereal e planta, produtos alimentares à base de sólido, comprimidos, aditivos alimentares, suplementos para a saúde e preparações farmacêuticas.

26. O produto de acordo com a reivindicação 25 em que os produtos alimentares à base de fluido incluem produtos à base de leite onde o ingrediente edível é um ou mais ingredientes à base de leite incluindo leite completo, sólidos de leite, gordura de leite, nata, leite seco não gordo, qualquer outro componente ou derivado do leite adequado para uso em produtos à base de leite.

27. O produto de acordo com a reivindicação 25 em que os produtos alimentares à base de sólido incluem barras de refeição ligeira ou «snack bars», cereais de pequeno-almoço, pão, confeitos, produtos alimentares extrudidos, barras de muesli, bolos de passas, biscoitos, peletes alimentares e produtos alimentares revestidos.

28. O produto de acordo com a reivindicação 24 sendo um produto alimentar adequado para conter e entregar microorganismos probióticos.

29. O produto alimentar de acordo com a reivindicação 28 seleccionado do grupo constituído por materiais alimentares, bebidas de fruta, gelados de água, confeitos, revestimentos ou coberturas, iogurtes, bebidas de iogurte, bebidas não fermentadas, bebidas de leite aromatizadas, bebidas de leite modificado, sorvete cremoso e sobremesas de lacticínios.

30. O uso de amido resistente em meios de cultura microbiana para produzir micróbios que quando subsequentemente usados num produto após serem colhidos dos meios têm uma razão de sobrevivência aumentada quando comparada com os mesmos micróbios crescidos ou cultivados em meios sem amido resistente.

31. O uso de acordo com a reivindicação 30 em que o produto é seleccionado do grupo constituído por um alimento, alimentação, produto nutracêutico, farmacêutico, de biocontrolo e de biorremediação.

32. O uso de acordo com a reivindicação 30 ou 31 em que o amido resistente é do tipo RS1, RS2, RS3 ou RS4.

33. O uso de acordo com a reivindicação 32 em que o amido resistente é derivado de amido seleccionado do grupo constituído por *maís, arroz, cevada, trigo, legumes, batatas e bananas.*

34. O uso de acordo com qualquer das reivindicações 30-33 em que o amido resistente é derivado de um amido tendo um conteúdo de amilose de pelo menos 40% (*m/m*).

35. O uso de acordo com a reivindicação 34 em que o amido resistente é derivado de amido de *maís.*

36. O uso de acordo com a reivindicação 35 em que o amido de *maís* tem um conteúdo de amilose de pelo menos 70% (*m/m*).

37. O uso de acordo com a reivindicação 35 em que o amido de *maís* tem um conteúdo de amilose de pelo menos 80% (*m/m*).

38. O uso de acordo com a reivindicação 35 em que o amido de *maís* tem um conteúdo de amilose de pelo menos 90% (*m/m*).

39. O uso de acordo com qualquer das reivindi-

cações 30-38 em que o amido é quimicamente, fisicamente e/ou enzimaticamente tratado ou modificado.

40. O uso de acordo com a reivindicação 39 em que a modificação química é seleccionada do grupo constituído por oxidação, ligação cruzada, eterificação, esterificação, acidificação, dextrinização e suas misturas.

41. O uso de acordo com a reivindicação 39 em que o tratamento físico é tratamento por calor-humidade para favorecer ou aumentar o conteúdo em amido resistente do amido.

42. O uso de acordo com a reivindicação 39 em que o tratamento é por extracção por solvente para remover gorduras e/ou minerais do amido.

Lisboa, 14 de Novembro de 2006

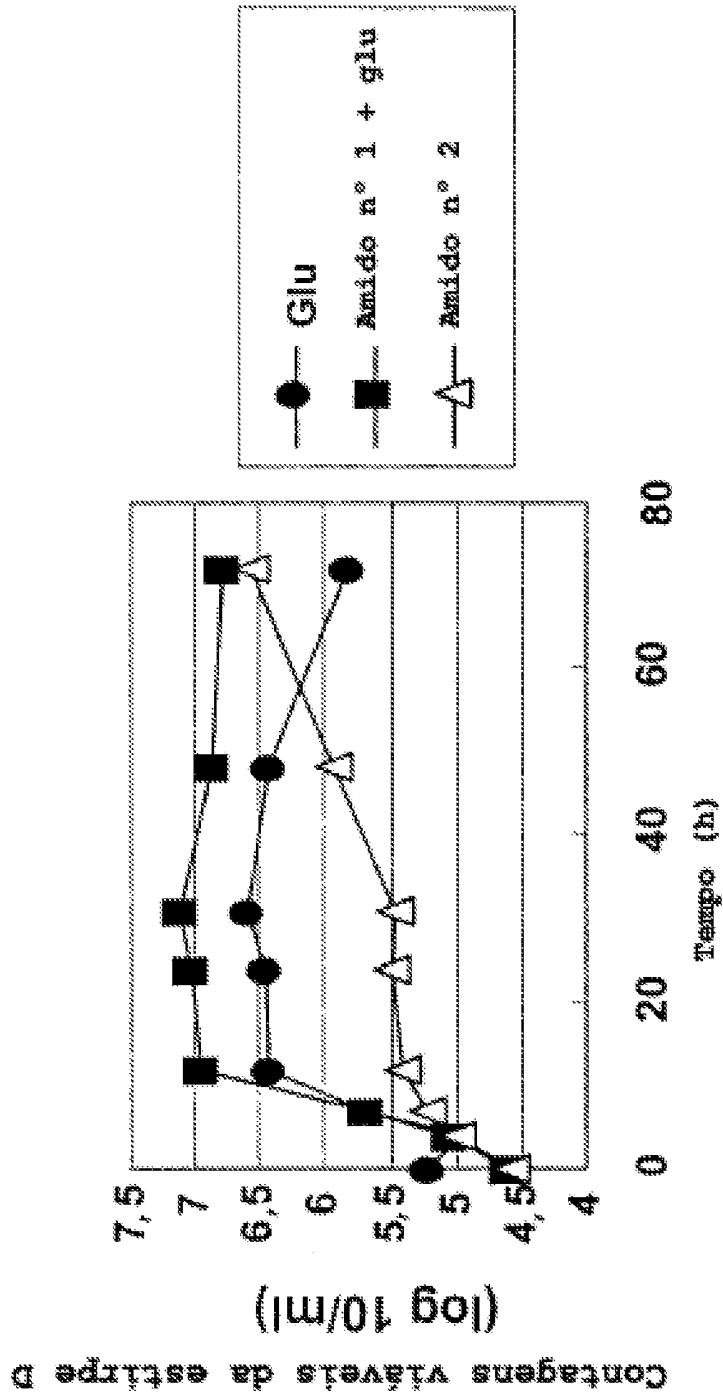


Figura 1

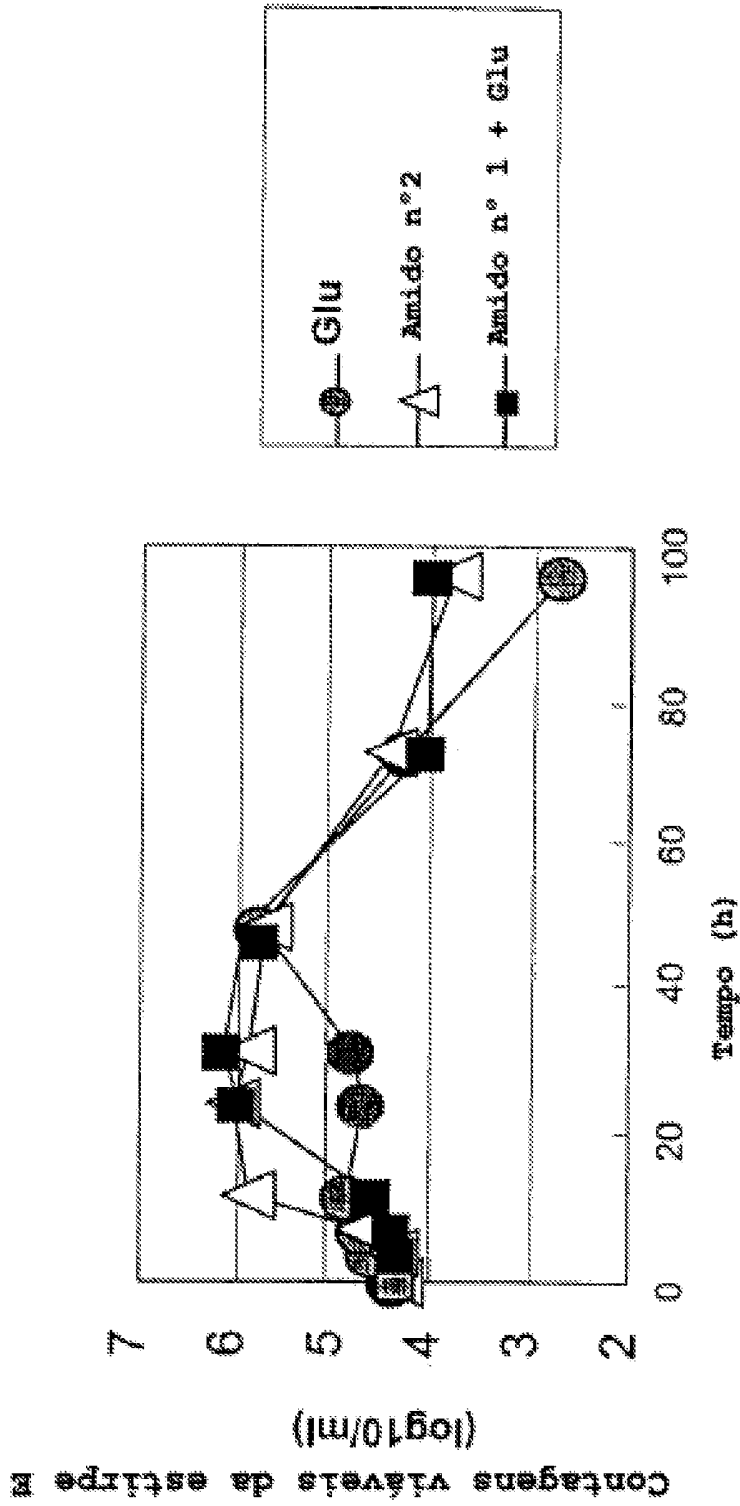


Figura 2

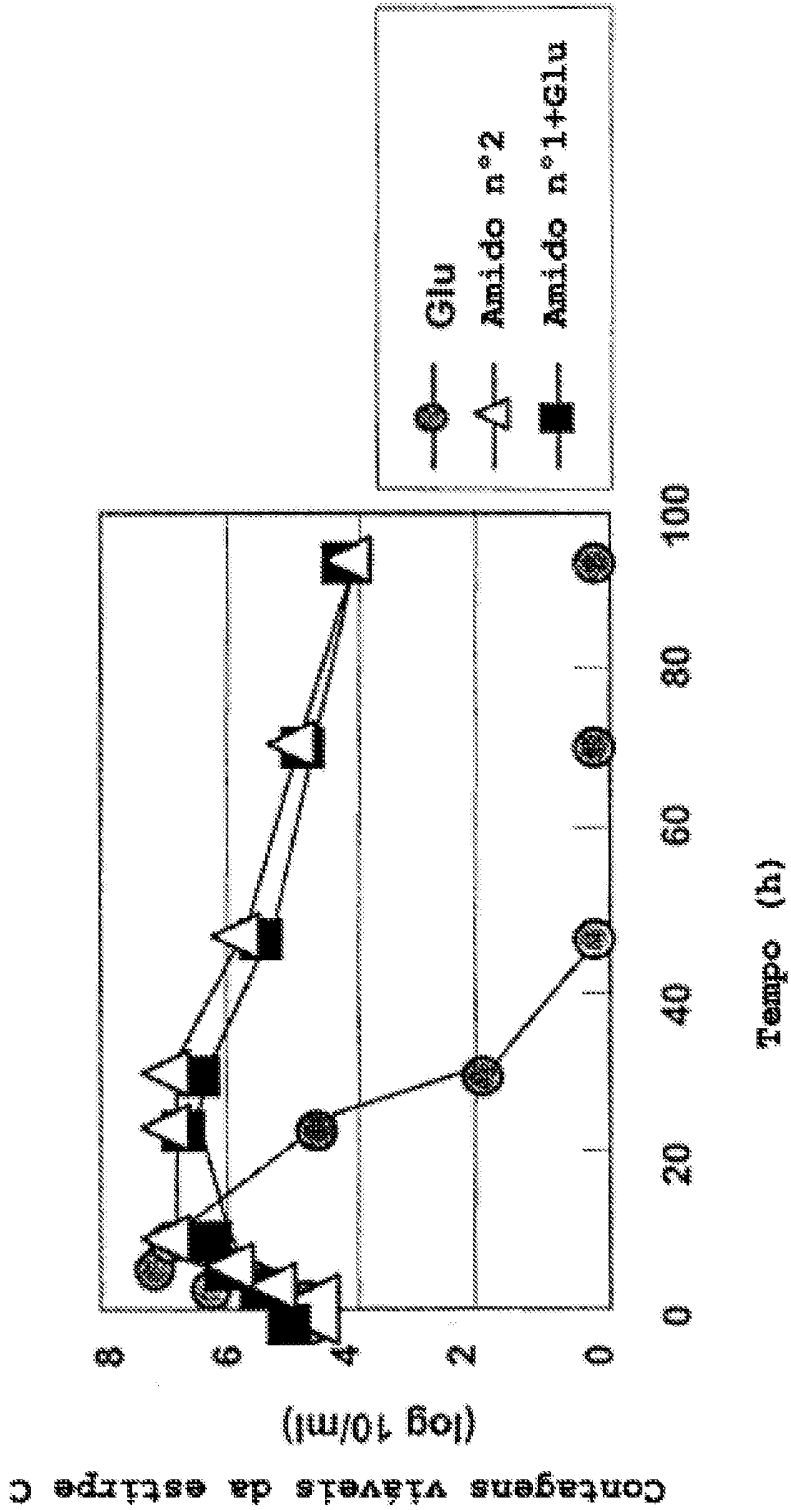


Figura 3

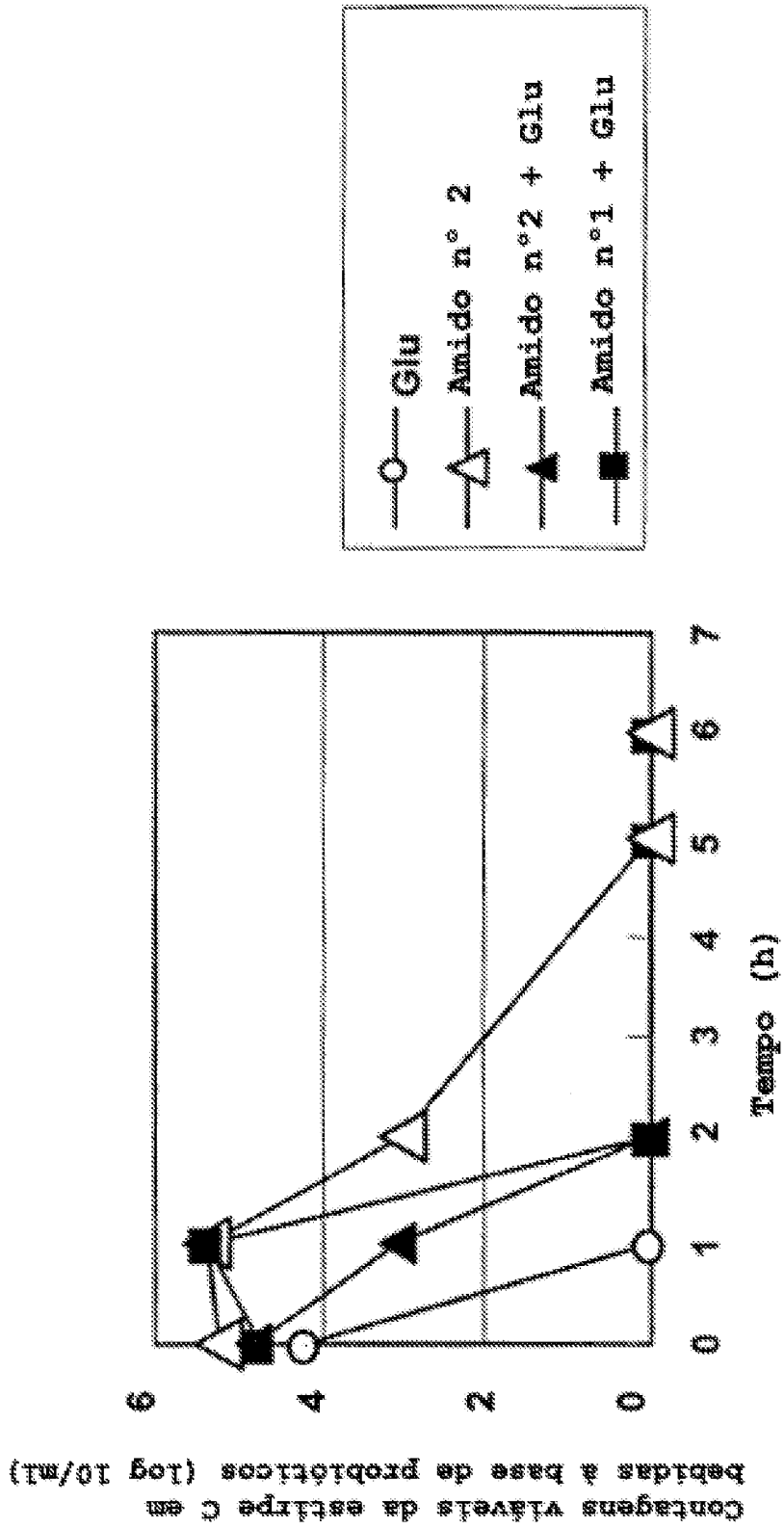


Figura 4

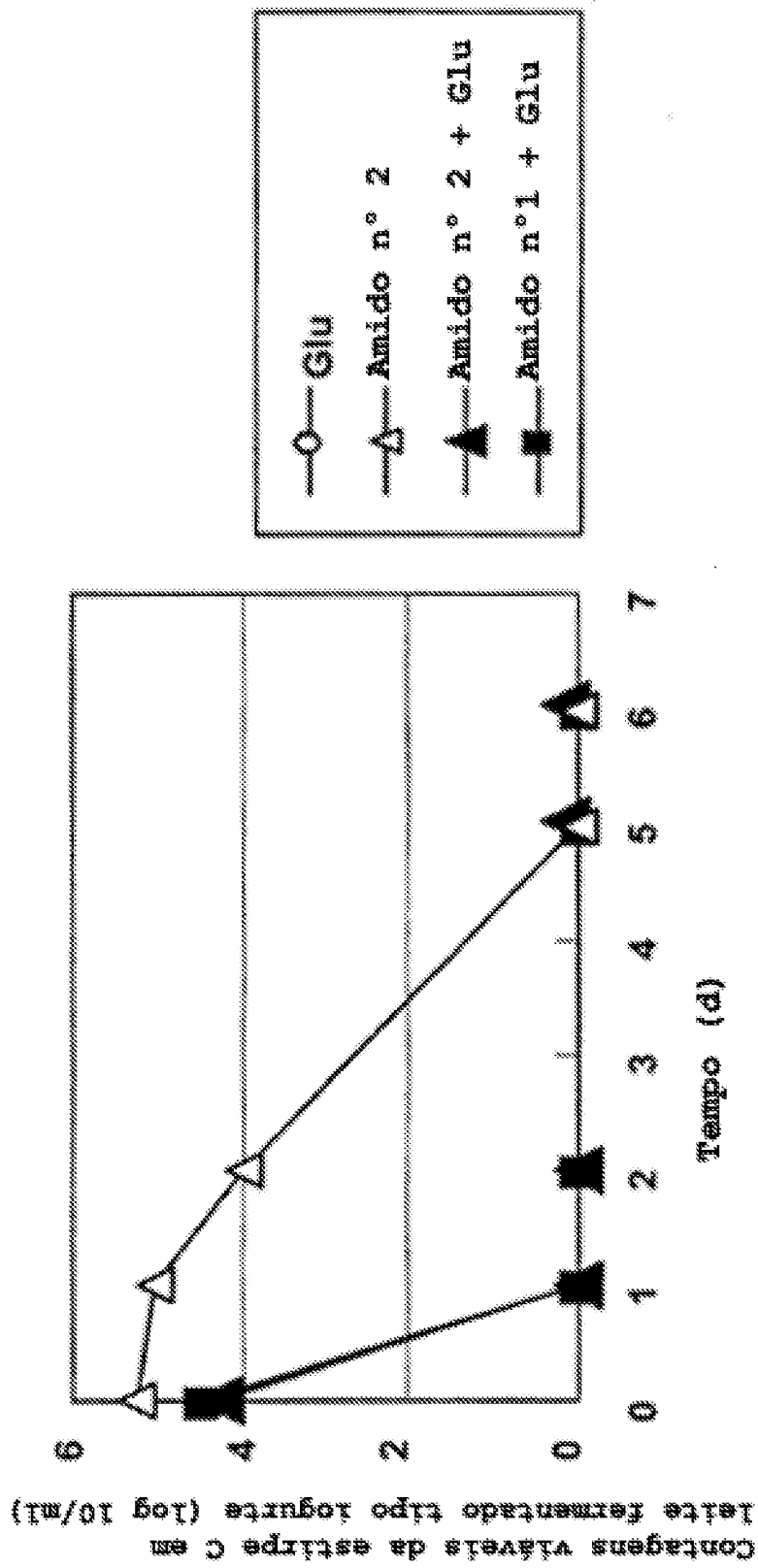


Figura 5

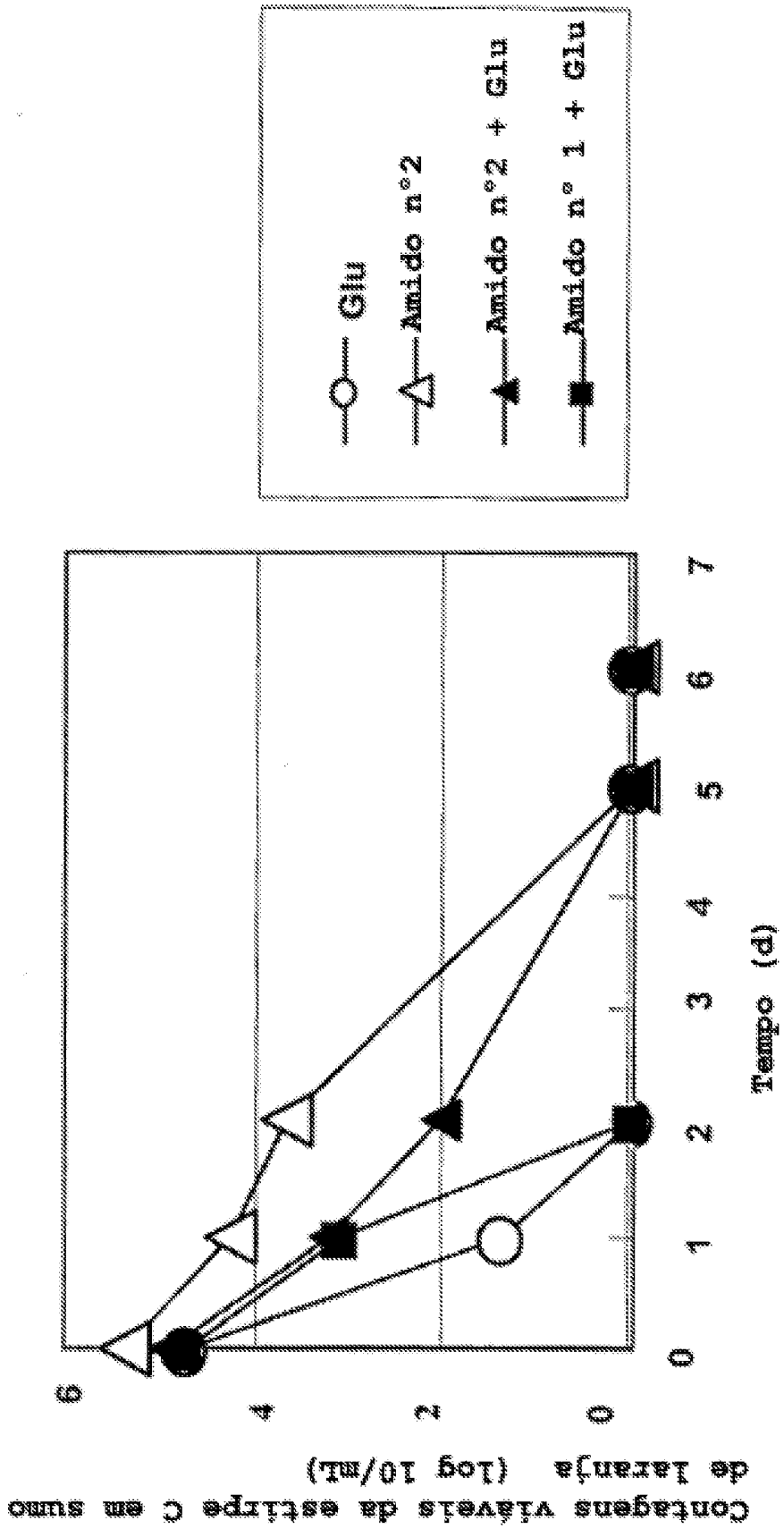


Figura 6

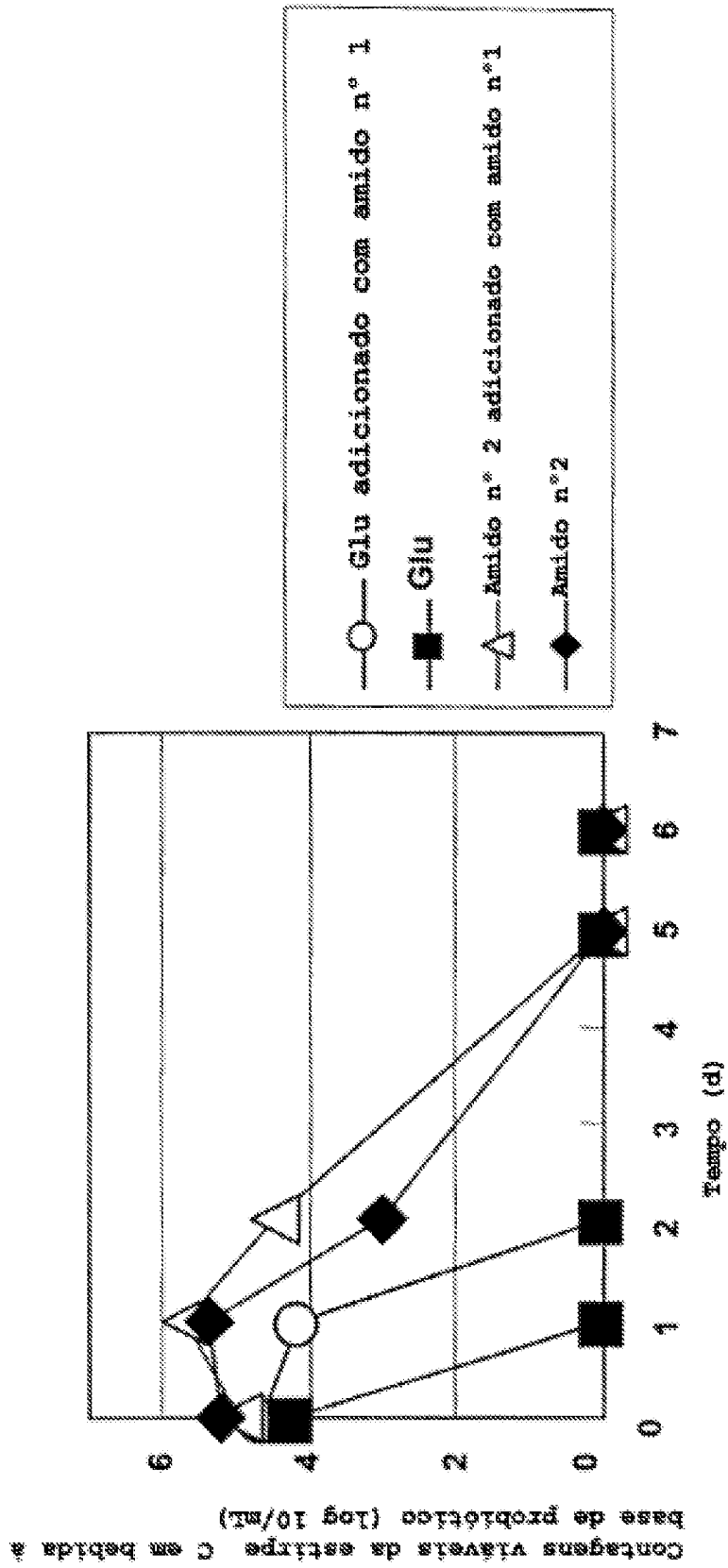


Figura 7

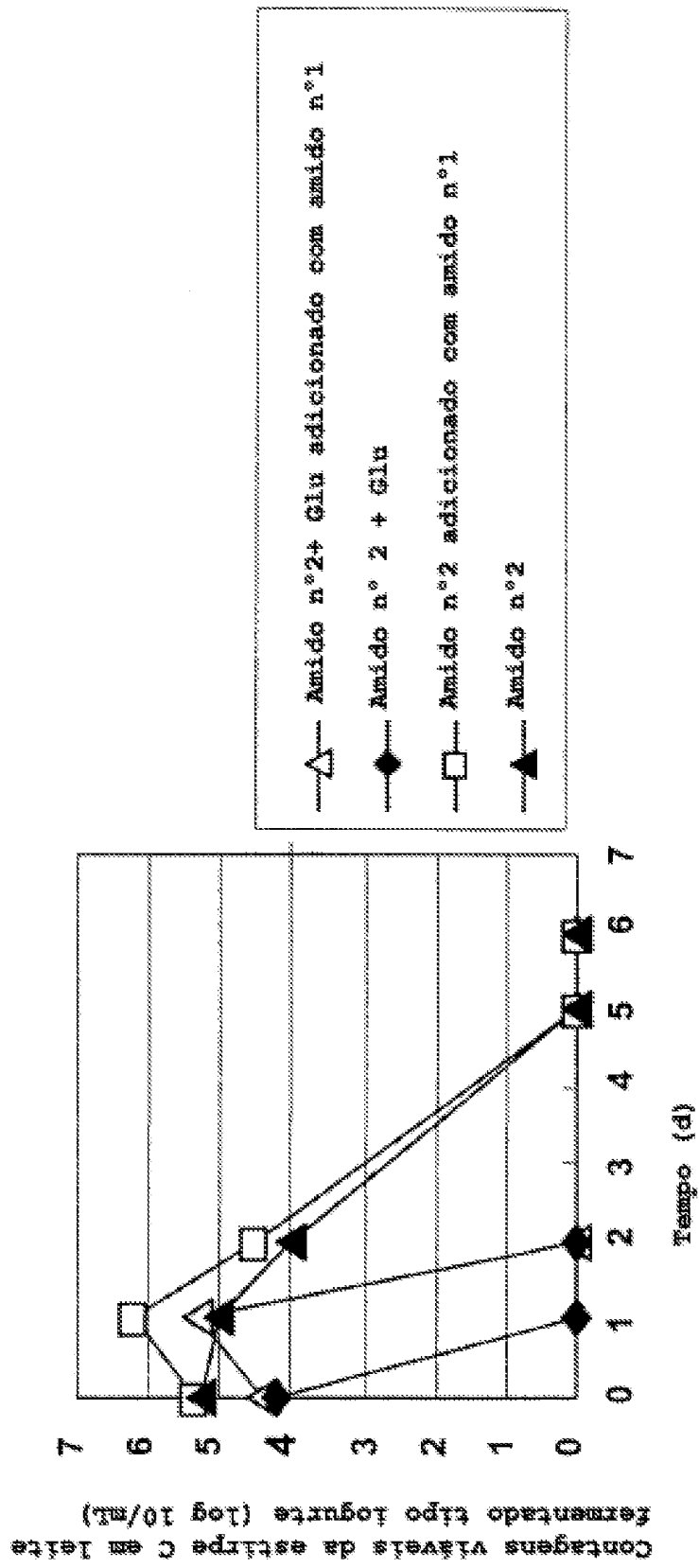


Figura 8

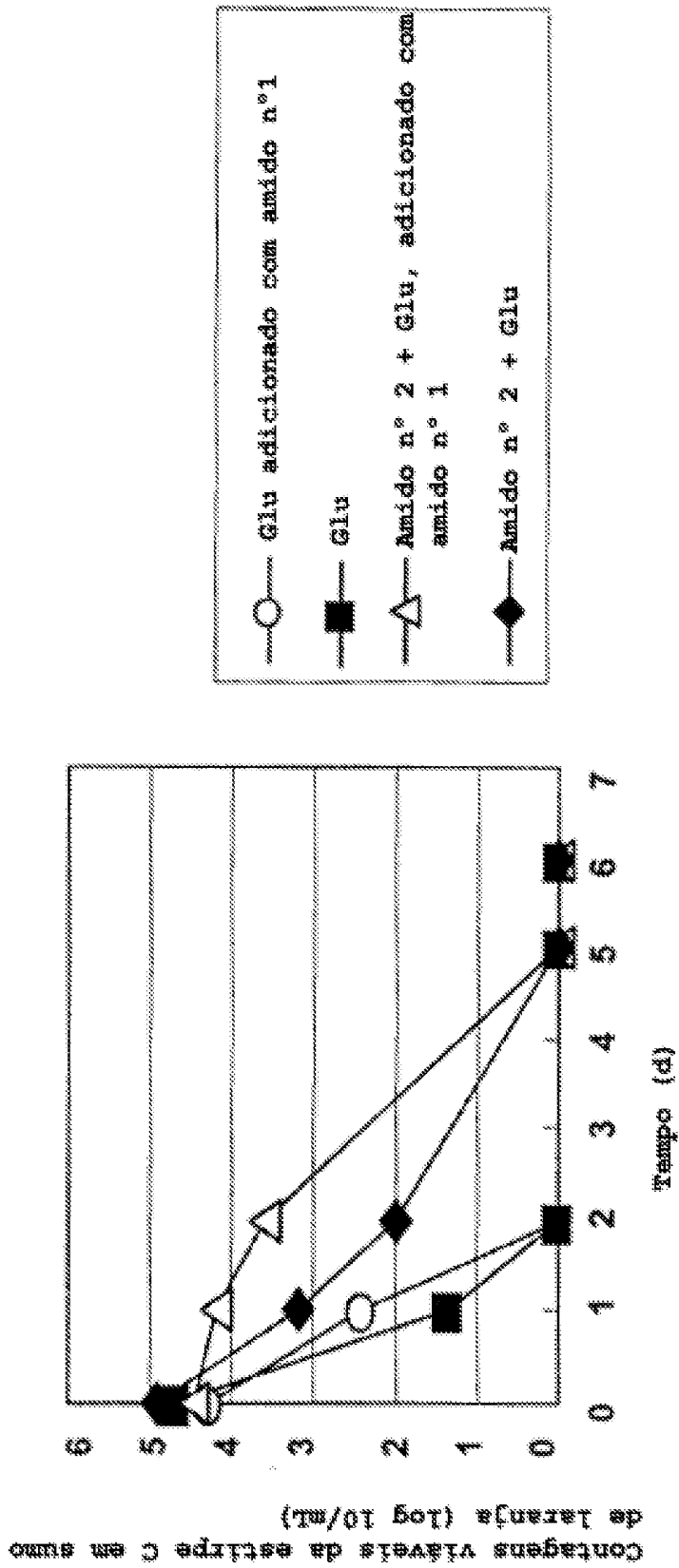


Figura 9

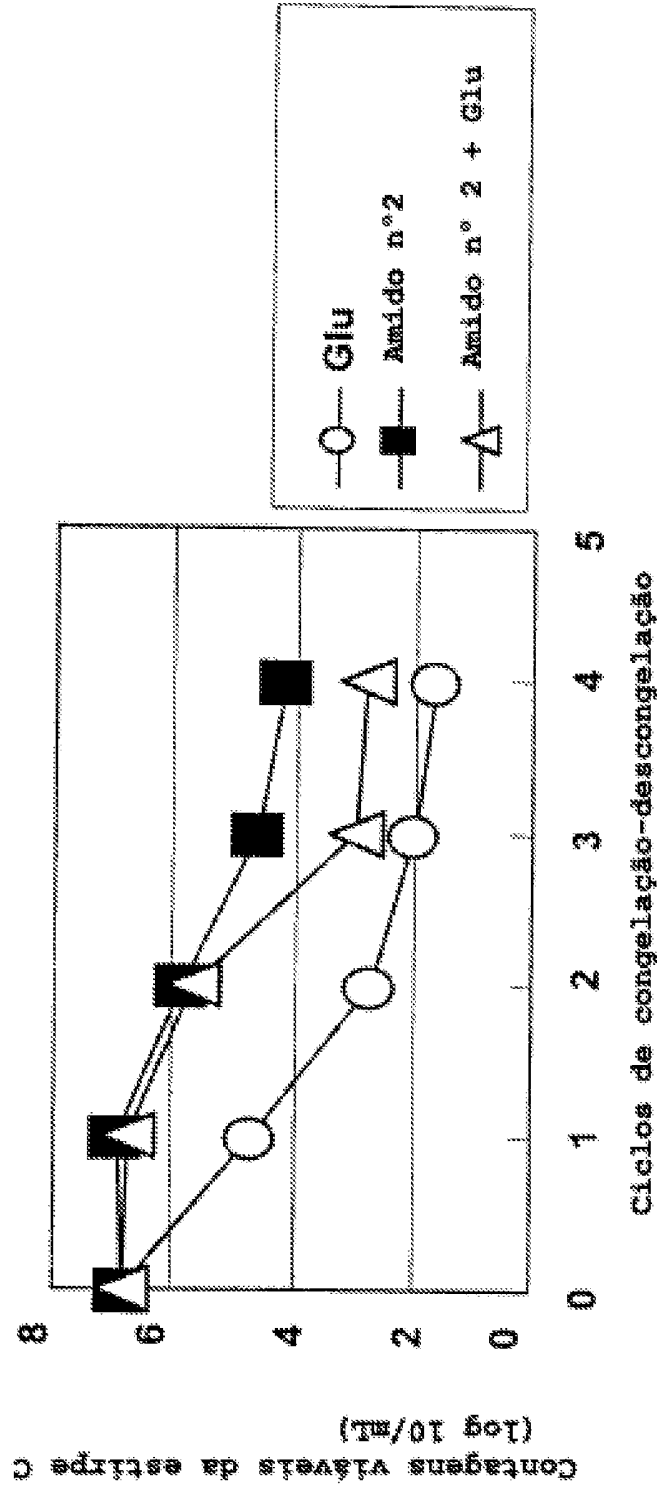


Figura 10

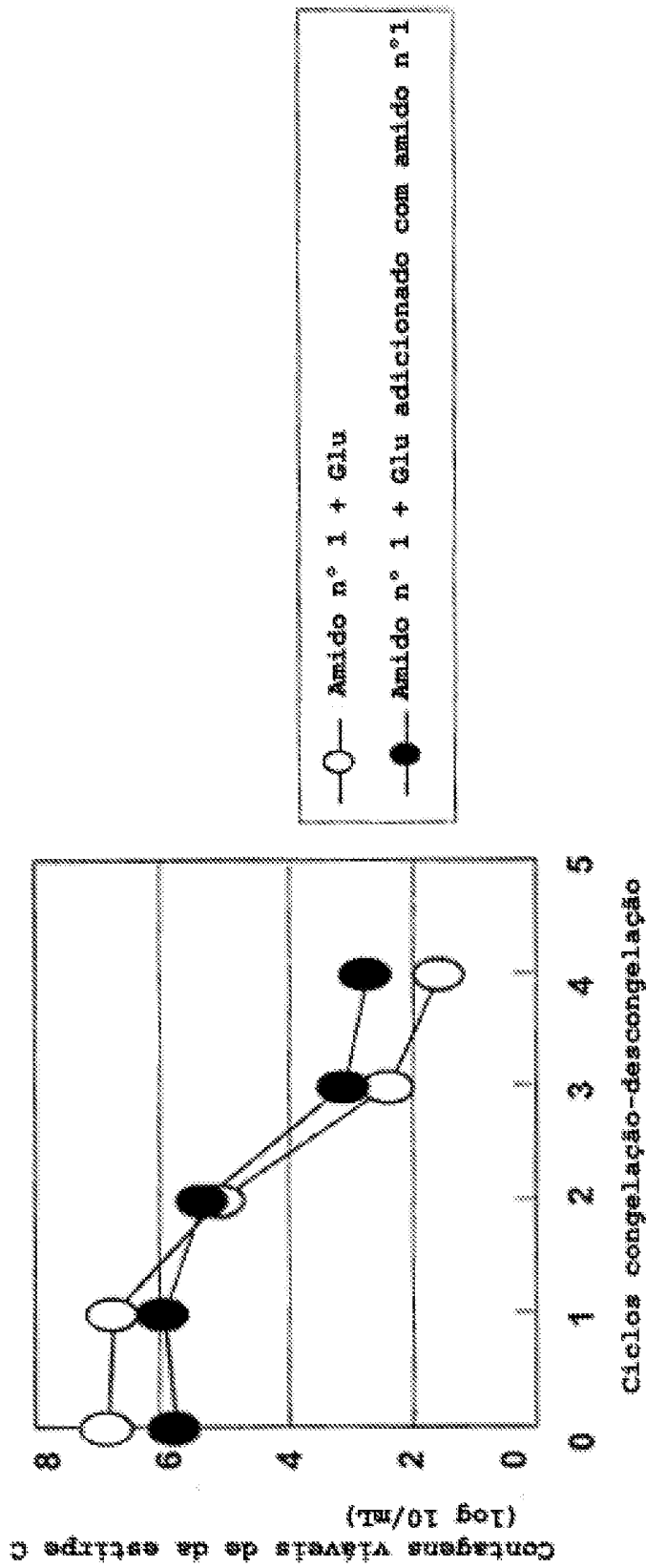


Figura 11

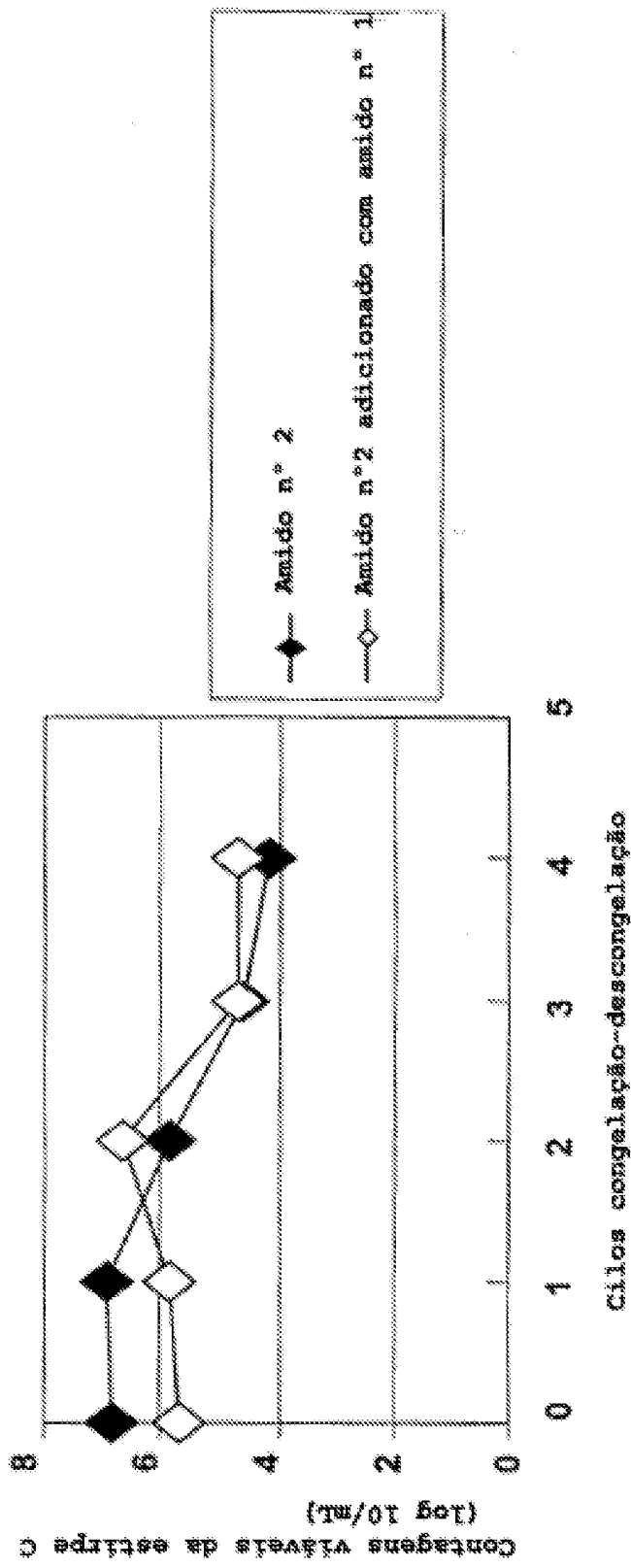


Figura 12

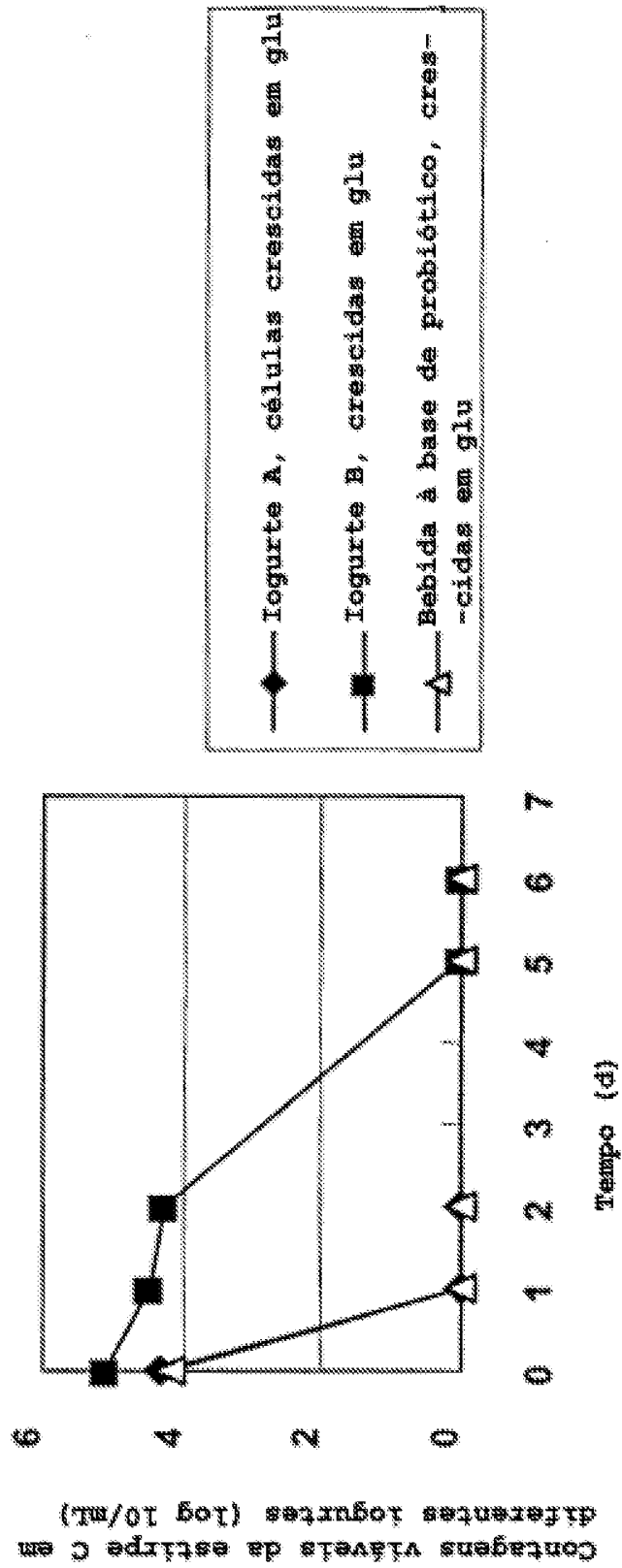


Figura 13

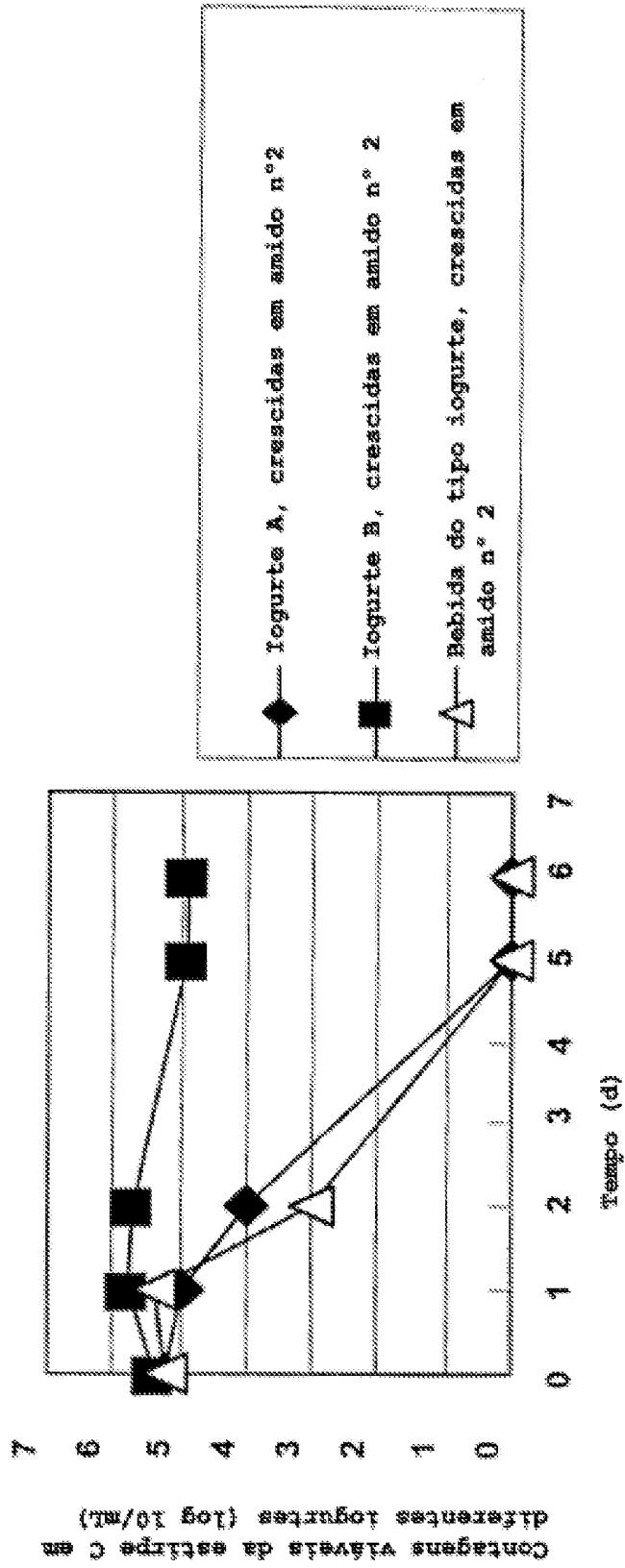


Figura 14